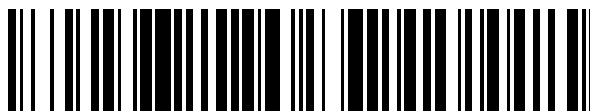


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 693**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.1999 E 99919725 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 1068238**

54 Título: **Heterodímero de integrina y subunidad del mismo**

30 Prioridad:

**02.04.1998 SE 9801164**

**28.01.1999 SE 9900319**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.02.2013**

73 Titular/es:

**XINTELA AB (100.0%)  
C/O EVY LUNDGREN AKERLUND  
TROLLSJOVAGEN 165  
237 33 BJARRED, SE**

72 Inventor/es:

**LUNDGREN-AKERLUND, EVY**

74 Agente/Representante:

ES 2 396 693 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Heterodímero de integrina y subunidad del mismo

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un heterodímero de integrina aislado o recombinante que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , a la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, a homólogos y fragmentos de dicha integrina y de dicha subunidad  $\alpha 10$  que tienen actividad biológica similar, a procedimientos de producción del mismo, a polinucleótidos y oligonucleótidos que codifican para el mismo, a vectores y células que comprenden el mismo, a entidades de unión que se unen específicamente al mismo, y al uso del mismo.

### Antecedentes de la invención

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas transmembrana que median en interacciones célula-célula y célula-matriz (1-5). Todos los miembros conocidos de esta superfamilia son heterodímeros asociados no covalentemente compuestos por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . En la actualidad, se han caracterizado 8 subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) (6) y 16 subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 9$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha X$ ,  $\alpha IIb$ ,  $\alpha E$  y  $\alpha D$ ) (6-21), y estas subunidades se asocian para generar más de 20 integrinas diferentes. Se ha mostrado que la subunidad  $\beta 1$  se asocia con diez subunidades  $\alpha$  diferentes,  $\alpha 1$ - $\alpha 9$  y  $\alpha v$ , y que media en interacciones con proteínas de la matriz extracelular tales como colágenos, lamininas y fibronectina. Las integrinas de unión a colágeno principales son  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  (22-25). Se ha notificado también que las integrinas  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 9\beta 1$  interaccionan con colágeno (26, 27) aunque esta interacción no se entiende bien (28). Las regiones N-terminales extracelulares de las subunidades de integrina  $\alpha$  y  $\beta$  son importantes en la unión de ligandos (29, 30). La región N-terminal de las subunidades  $\alpha$  está compuesta por una secuencia repetida siete veces (12, 31) que contiene secuencias consenso FG y GAP. Se pronostica que las repeticiones se pliegan en un dominio de hélice  $\beta$  (32) conteniendo las últimas tres o cuatro repeticiones supuestos sitios de unión de cationes divalentes. Las subunidades de integrina  $\alpha$   $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$  y  $\alpha X$  contienen un dominio insertado de ~200 aminoácidos, el dominio I (dominio A), que muestra similitud con secuencias en el factor de von Willebrand, la proteína de la matriz de cartílago y los factores del complemento C2 y B (33, 34). El dominio I se localiza entre las repeticiones de FG-GAP segunda y tercera, contiene un sitio de adhesión dependiente de ión metálico (MIDAS) y está implicado en la unión de ligandos (35-38).

Los condrocitos, el único tipo de células en el cartílago, expresan varias integrinas diferentes incluyendo  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$  (39-41). Se ha mostrado que  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  median en interacciones de condrocitos con colágeno tipo II (25) que es uno de los componentes principales en el cartílago. Se ha mostrado también que  $\alpha 2\beta 1$  es un receptor para la proteína de la matriz de cartílago condroadherina (42).

Holmvall *et al* (Exp. Cell Res. Vol. 221, 1995, págs. 496-503) describen la investigación de integrinas de condrocitos con afinidad por colágeno tipo II así como cambios en la expresión de ARNm que codifican para colágeno tipo II, agregano y diversas subunidades de integrina en respuesta a estrés mecánico dinámico. Además, Camper *et al*. encontraron una integrina  $\beta 1$  de unión a colágeno tipo II con una subunidad  $\alpha$  ligeramente mayor que  $\alpha 2$ . Esta subunidad de integrina estaba presente tanto en condrocitos bovi-

nos como células de condrosarcoma humanas pero no pudieron identificarla con ningún anticuerpo frente a  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , o  $\alpha 9$ . Este estudio no se realizó en condrocitos humanos.

5 Camper *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 273, 1998, págs. 1159-1167) es un artículo publicado posteriormente que describe el aislamiento, la clonación y el análisis de secuencia de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, una integrina de unión a colágeno asociada a  $\beta 1$  expresada en condrocitos.

### Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a una integrina de unión a colágeno tipo II novedosa, que comprende una subunidad  $\alpha 10$  en asociación con una subunidad  $\beta$ , especialmente una subunidad  $\beta 1$ , pero también pueden contemplarse otras subunidades  $\beta$ . En realizaciones preferidas, esta integrina se ha aislado de condrocitos articulares bovinos o humanos, y células de condrosarcoma humanas.

15 La presente invención se refiere en particular a una subunidad  $\alpha 10$  de integrina aislada o recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, y homólogos y o fragmentos de la misma según la reivindicación 1.

20 La invención se refiere además a un procedimiento de producción de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o fragmentos de la misma, procedimiento que comprende las etapas de

- a) aislar un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmentos de la misma,
- b) construir un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado,
- c) transformar una célula huésped con dicho vector de expresión,
- 25 d) cultivar dicha célula huésped transformada en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmentos de la misma, en dicha célula huésped transformada, y, opcionalmente,
- e) aislar la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmentos de la misma, a partir de dicha célula huésped transformada o dicho medio de cultivo.

30 La subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmentos de la misma, puede proporcionarse también mediante aislamiento a partir de una célula en la que está presente de manera natural.

35 La invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende un nucleótido que codifica para subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmentos de la misma según la reivindicación 1, polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o partes de la misma.

40 La invención se refiere en un aspecto adicional a vectores que comprenden los polinucleótidos anteriores, y a células que contienen dichos vectores y células que tienen polinucleótidos u oligonucleótidos mostrados en SEQ ID No. 1 ó 2 integrados en su genoma.

La invención también se refiere a entidades de unión que tienen la capacidad de unirse específicamente a la subunidad  $\alpha 10$  de integrina o fragmentos de la misma, tales como proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos, ligandos naturales, anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

- 5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un heterodímero de integrina aislado o recombinante que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , en el que la subunidad  $\alpha 10$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o fragmentos de la misma.

En una realización preferida de la misma, la subunidad  $\beta$  es  $\beta 1$ .

- 10 La invención también se refiere a un procedimiento de producción de un heterodímero de integrina recombinante que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , en el que la subunidad  $\alpha 10$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, procedimiento que comprende las etapas de

- 15 a) aislar un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una subunidad  $\alpha 10$  de un heterodímero de integrina y, opcionalmente, otro polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una subunidad  $\beta$  de un heterodímero de integrina, o fragmentos de la misma,

- 20 b) construir un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido aislado que codifica para dicha subunidad  $\alpha 10$  en combinación con un vector de expresión que comprende dicho nucleótido aislado que codifica para dicha subunidad  $\beta$ ,

c) transformar una célula huésped con dichos vectores de expresión,

- 25 d) cultivar dicha célula huésped transformada en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para la expresión de un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo, en dicha célula huésped transformada, y, opcionalmente,

e) aislar el heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo, a partir de dicha célula huésped transformada o dicho medio de cultivo.

- 30 El heterodímero de integrina, o fragmentos del mismo, también puede proporcionarse mediante aislamiento a partir de una célula en la que está presente de manera natural.

- 35 La invención se refiere además a una célula que contiene un primer vector, comprendiendo dicho primer vector un polinucleótido que codifica para una subunidad  $\alpha 10$  de un heterodímero de integrina, o partes de la misma, polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o partes de la misma, y, opcionalmente, un segundo vector, comprendiendo dicho segundo vector un polinucleótido que codifica para una subunidad  $\beta$  de un heterodímero de integrina, o fragmentos de la misma.

- 40 Todavía en otro aspecto, la invención se refiere a entidades de unión que tienen la capacidad de unirse específicamente al heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo, preferiblemente en el que la subunidad  $\beta$  es  $\beta 1$ . Entidades de unión preferidas son proteínas, péptidos, hidratos

de carbono, lípidos, ligandos naturales, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un fragmento de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, fragmento que es un péptido elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado.

En una realización, dicho fragmento es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ.

10 En otra realización, dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 952 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1.

En una realización adicional, dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 140 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 337 en SEQ ID No. 1.

15 Otra realización de la invención se refiere a un polinucleótido u oligonucleótido que codifica para un fragmento de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina humana. En una realización, este polinucleótido u oligonucleótido codifica para un fragmento que es un péptido elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado. En realizaciones adicionales, el polinucleótido u oligonucleótido codifica para los fragmentos definidos anteriormente.

20 La invención también se refiere a entidades de unión que tienen la capacidad de unirse específicamente a un fragmento de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina tal como se definió anteriormente.

25 La invención también se refiere a un procedimiento de uso de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o un heterodímero de integrina que comprende dicha subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o un homólogo o fragmento de dicha integrina o subunidad que tiene actividad biológica similar, como marcador o molécula diana de células o tejidos que expresan dicha subunidad  $\alpha 10$  de integrina, células o tejidos que son de origen animal incluyendo humano.

30 En una realización de este procedimiento, el fragmento es un péptido elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado.

35 En realizaciones adicionales de dicho procedimiento, el fragmento es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 952 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 140 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 337 de SEQ ID no. 1.

40 La subunidad  $\beta$  es preferiblemente  $\beta 1$ . Las células se eligen preferiblemente del grupo que comprende condrocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos.

Dicho procedimiento puede usarse durante estados patológicos que implican a dicha subunidad  $\alpha 10$ , tales como estados patológicos que comprenden daño de cartílago, o que comprenden traumatismo, artritis reumatoide y osteoartritis.

5 Dicho procedimiento puede usarse para detectar la formación de cartílago durante el desarrollo embrionario, o para detectar la reparación fisiológica o terapéutica de cartílago.

Dicho procedimiento puede usarse también para la selección y el análisis, o para la clasificación, el aislamiento o la purificación de condrocitos.

10 Una realización adicional de dicho procedimiento es un procedimiento para detectar la regeneración de cartílago o condrocitos durante el trasplante de cartílago o condrocitos.

Todavía una realización adicional de dicho procedimiento es un procedimiento para estudios *in vitro* de diferenciación de condrocitos.

15 La invención también comprende un procedimiento de uso de entidades de unión que tienen la capacidad de unirse específicamente a una subunidad  $\alpha 10$  de integrina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o un heterodímero de integrina que comprende dicha subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo, como marcadores o moléculas diana de células o tejidos que expresan dicha subunidad  $\alpha 10$  de integrina, células o tejidos que son de origen animal incluyendo humano.

20 El fragmento en dicho procedimiento puede ser un péptido elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado. En realizaciones preferidas, dicho fragmento es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 952 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1, o un fragmento que  
25 comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 140 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 337 de SEQ ID No. 1.

30 El procedimiento puede usarse también para detectar la presencia de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o de un heterodímero de integrina que comprende dicha subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo.

En una realización adicional, dicho procedimiento es un procedimiento para determinar el estado de diferenciación de células durante el desarrollo embrionario, la angiogénesis o el desarrollo de cáncer.

35 Todavía en una realización adicional, este procedimiento es un procedimiento para detectar la presencia de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, o fragmento de dicha subunidad de integrina, en células, mediante lo cual un polinucleótido u oligonucleótido elegido del grupo que comprende un polinucleótido u oligonucleótido elegido de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 se usa como marcador en condiciones de hibridación en las que dicho polinucleótido u oligonucleótido no puede hibridarse con un  
40 ADN o ARN que codifica para una subunidad  $\alpha 1$  de integrina. Dichas células pueden elegirse del grupo que comprende condrocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos. Dicho fragmento de integrina puede ser un péptido

elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado, tal como un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 952 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1, o un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 140 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 337 de SEQ ID No. 1.

Todavía en una realización adicional, el procedimiento es un procedimiento para determinar el estado de diferenciación de células durante el desarrollo, en estados patológicos, en regeneración de tejidos o en reparación fisiológica y terapéutica de cartílago. Los estados patológicos pueden ser cualquier estado patológico que implique a la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, tales como artritis reumatoide, osteoartritis o cáncer. Las células pueden elegirse del grupo que comprende condrocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos.

La invención también se refiere a un procedimiento para determinar el estado de diferenciación de células durante el desarrollo, en estados patológicos, en regeneración de tejidos y en reparación fisiológica y terapéutica de cartílago, mediante lo cual un polinucleótido u oligonucleótido elegido de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 se usa como marcador en condiciones de hibridación en las que dicho polinucleótido u oligonucleótido no puede hibridarse con un ADN o ARN que codifica para una subunidad  $\alpha 1$  de integrina. Realizaciones de este aspecto comprenden un procedimiento mediante el cual dicho polinucleótido u oligonucleótido es un polinucleótido u oligonucleótido que codifica para un péptido elegido del grupo que comprende péptidos del dominio citoplasmático, el dominio I y el dominio cortado y empalmado, tal como un polinucleótido u oligonucleótido que codifica para un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, o que comprende la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 952 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1, o la secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido n.º 140 hasta aproximadamente el aminoácido n.º 337 de SEQ ID No. 1. Dichos estados patológicos pueden ser cualquier estado patológico que implique a la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, tales como artritis reumatoide, osteoartritis o cáncer, o aterosclerosis o inflamación. Dichas células pueden elegirse del grupo que comprende condrocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un agente farmacéutico o un anticuerpo que puede usar un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad  $\alpha 10$ , como molécula diana. Una realización de dicha composición farmacéutica está destinada para su uso en la estimulación, la inhibición o el bloqueo de la formación de cartílago, hueso o vasos sanguíneos. Una realización adicional comprende una composición farmacéutica para su uso en la prevención de la adhesión entre tendones/ligamentos y el tejido circundante tras infección, inflamación y tras intervención quirúrgica en la que la adhesión afecta a la función del tejido.

La invención también se refiere a una vacuna que comprende como principio activo un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la

subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad  $\alpha 10$ , o ADN o ARN que codifica para dicha subunidad  $\alpha 10$  de integrina.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina tal como se definió anteriormente como marcador o diana en trasplante de cartílago o condrocitos.

Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de uso de entidades de unión que tienen la capacidad de unirse específicamente a una subunidad  $\alpha 10$  de integrina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, o un heterodímero de integrina que comprende dicha subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o fragmentos del mismo, para promover la adhesión de condrocitos y/o osteoblastos a superficies de implantes para estimular la integración ósea.

La invención se refiere también al uso de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina o un heterodímero de integrina que comprende dicha subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$  como diana para moléculas o fármacos antiadhesivos en tendón, ligamento, músculo esquelético u otros tejidos en los que la adhesión afecta a la función del tejido.

La invención también se refiere a un método de estimulación, inhibición o bloqueo de la formación de cartílago o hueso, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad adecuada de un agente farmacéutico o un anticuerpo que puede usar un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad  $\alpha 10$ , como molécula diana.

En otra realización, la invención se refiere a un método de prevención de la adhesión entre tendones/ligamentos y el tejido circundante tras infección, inflamación y tras intervención quirúrgica en la que la adhesión afecta a la función del tejido, que comprende administración a un sujeto de una cantidad adecuada de un agente farmacéutico o un anticuerpo que puede usar un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad  $\alpha 10$ , como molécula diana.

La invención también se refiere a un método de estimulación de la síntesis y reparación de la matriz extracelular mediante activación o bloqueo de un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o de la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad  $\alpha 10$ .

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de detección *in vitro* de la presencia de entidades de unión a integrina, que comprende la interacción de un heterodímero de integrina que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad, con una muestra, provocando de ese modo que dicha integrina, subunidad  $\alpha 10$ , u homólogo o fragmento de la misma, module la unión a su ligando natural u otras proteínas de unión a integrina presentes en dicha muestra.

La invención también se refiere a un método de estudio *in vitro* de las consecuencias de la interacción de una integrina de heterodímero humana que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad, con una entidad de unión a integrina e iniciar de ese modo una re-



acción celular. Dichas consecuencias pueden medirse como alteraciones en funciones celulares.

La invención también se refiere a un método de uso de una integrina de heterodímero humana que comprende una subunidad  $\alpha 10$  y una subunidad  $\beta$ , o la subunidad  $\alpha 10$  del mismo, o fragmento de dicha integrina o subunidad, o un ADN o ARN que codifica para una subunidad  $\alpha 10$  de integrina o fragmentos de la misma, como marcador o molécula diana durante la angiogénesis.

#### Breve descripción de las figuras

10 Figura 1. Purificación por afinidad de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  sobre colágeno tipo II-Sepharose.

Figura 2. Secuencias de aminoácidos de péptidos de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  bovina.

Figura 3a. Purificación por afinidad e inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina a partir de condrocitos bovinos.

15 Figura 3b. Purificación por afinidad e inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina a partir de condrocitos humanos.

Figura 3c. Purificación por afinidad e inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina a partir de células de condrosarcoma humanas.

20 Figura 4. Un fragmento de PCR de 900 pb que corresponde a la subunidad  $\alpha 10$  de integrina bovina.

Figura 5. Mapa esquemático de los tres clones de  $\alpha 10$  solapantes.

Figura 6. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  humana.

Figura 7. Transferencia de tipo Northern de ARNm de integrina  $\alpha 10$ .

25 Figura 8. Inmunoprecipitación de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  a partir de condrocitos humanos usando anticuerpos contra el dominio citoplasmático de  $\alpha 10$  (a). Inmunotransferencia de tipo Western de la cadena  $\beta$  asociada a  $\alpha 10$  (b).

Figura 9. Inmunotinción de integrina  $\alpha 10$  en cartílago articular humano.

30 Figura 10. Inmunotinción de integrina  $\alpha 10$  en cartílago de extremidades de ratón de 3 días.

Figura 11. Inmunotinción de integrina  $\alpha 10$  en embrión de ratón de 13,5 días.

Figura 12. Hibridación de ARNm de  $\alpha 10$  en diversos tejidos humanos.

Figura 13. Inmunotinción de la fascia alrededor del tendón (a), músculo esquelético (b) y válvulas cardíacas (c) en extremidad de ratón de 3 días.

35 Figura 14. Fragmentos de PCR correspondientes a la subunidad de integrina  $\alpha 10$  a partir de condrocitos humanos, células endoteliales humanas, fibroblastos humanos y tendón de rata.

Figura 15. Secuencia de nucleótidos genómica parcial de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina humana.

Figura 16. Regulación por incremento de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en condrocitos cultivados en alginato.

- 5 Figura 17. Inmunoprecipitación de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  a partir de células de músculo liso humanas.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención demuestra que los condrocitos humanos y bovinos expresan una integrina de unión a colágeno tipo II novedosa en la familia  $\beta 1$ . Un estudio anterior presentó algunas pruebas de que células de condrosarcoma humanas también expresan esta integrina (25). Experimentos de inmunoprecipitación usando anticuerpos contra la subunidad  $\beta 1$  de integrina revelaron que esta subunidad de integrina  $\alpha$  novedosa tenía un peso molecular aparente ( $M_r$ ) de aproximadamente 160 kDa en condiciones reductoras, y era ligeramente mayor que la subunidad de integrina  $\alpha 2$ . Para aislar esta subunidad  $\alpha$ , se purificaron por afinidad proteínas de unión a colágeno tipo II a partir de condrocitos bovinos. Se aplicó en primer lugar el lisado de condrocitos a una precolumna de fibronectina-Sepharose y entonces se aplicó la fracción no retenida a una columna de colágeno tipo II-Sepharose. Se eluyó específicamente una proteína con  $M_r$  de aproximadamente 160 kD con EDTA a partir de la columna de colágeno pero no a partir de la columna de fibronectina. El  $M_r$  de esta proteína correspondía con el  $M_r$  de la subunidad de integrina relacionada con  $\beta 1$  no identificada. Se cortó la banda de proteína de 160 kD del gel de SDS-PAGE, se digirió con tripsina y se analizaron las secuencias de aminoácidos de los péptidos aislados.

25 Cebadores que correspondían a péptidos aislados amplificaron un fragmento de PCR de 900 pb a partir de ADNc bovino que se clonó, se secuenció y se usó para examinar una biblioteca de ADNc  $\lambda$ ZapII de condrocitos articulares humanos para obtener el homólogo de subunidad  $\alpha$  de integrina humana. Se aislaron dos clones solapantes, hc1 y hc2, se subclonaron y se secuenciaron. Estos clones contenían 2/3 de la secuencia de nucleótidos incluyendo el extremo 3' del ADNc. Se obtuvo un tercer clon que contenía el extremo 5' del ADNc de  $\alpha 10$ , usando la técnica de RACE. El análisis de secuencia de la secuencia de proteína de 160 kD mostró que era un miembro de la familia de subunidades  $\alpha$  de integrinas y la proteína se denominó  $\alpha 10$ .

35 Se encontró que la secuencia de aminoácidos deducida de  $\alpha 10$  compartía la estructura general de las subunidades  $\alpha$  de integrinas descrita en informes publicados previamente (6-21). La parte N-terminal extracelular grande de  $\alpha 10$  contiene una secuencia repetida siete veces que se pronosticó recientemente que se pliega en un dominio de hélice  $\beta$  (32). La subunidad  $\alpha 10$  de integrina contiene tres supuestos sitios de unión a catión divalente (DxD/NxD/NxxD) (53), un único dominio que abarca la membrana y un dominio citoplasmático corto. En contraposición a la mayoría de las subunidades  $\alpha$  de integrinas, el dominio citoplasmático de  $\alpha 10$  no contiene la secuencia conservada KxGFF (R/K) R. La secuencia de aminoácidos pronosticada en  $\alpha 10$  es KLGFFAH. Varios informes indican que los dominios citoplasmáticos de integrinas son cruciales en la transducción de señales (54) y que las regiones próximas a la membrana de los domi-

nios citoplasmáticos de integrinas tanto  $\alpha$  como  $\beta$  están implicados en la modulación de la conformación y el estado de afinidad de integrinas (55-57). Se sugiere que el motivo GFFKR en cadenas  $\alpha$  es importante para la asociación de subunidades de integrinas y para el transporte de la integrina a la membrana plasmática (58). Se ha mostrado que el dominio KxGFFKR interacciona con la proteína intracelular calreticulina (59) y, de manera interesante, células madre embrionarias sin calreticulina son deficientes en la adhesión celular mediada por integrinas (60). Por tanto, es posible que la secuencia KLGFFAH en  $\alpha10$  tenga una función clave en la regulación de la afinidad entre  $\alpha10\beta1$  y proteínas de la matriz.

Se sabe que las subunidades  $\alpha$  de integrinas comparten una identidad global del 20-40% (61). El análisis de secuencia mostró que la subunidad  $\alpha10$  está lo más estrechamente relacionada con las subunidades  $\alpha$  que contienen dominio I, con identidad máxima con  $\alpha1$  (37%) y  $\alpha2$  (35%). Las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  son receptores conocidos para tanto colágenos como lamininas (24; 62; 63) y se ha demostrado también recientemente que  $\alpha2\beta1$  interacciona con la proteína de la matriz de cartílago condroadherina (42). Puesto que se aisló  $\alpha10\beta1$  sobre colágeno tipo II-Sepharose, se sabe que el colágeno tipo II es un ligando para  $\alpha10\beta1$ . Se ha mostrado también mediante experimentos de purificación por afinidad que  $\alpha10\beta1$  interacciona con colágeno tipo I pero queda por ver si la laminina o condroadherina son también ligandos para esta integrina.

La cadena  $\beta$  asociada a  $\alpha10$  migró como la subunidad de integrina  $\beta1$  en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Para verificar que la cadena  $\beta$  asociada a  $\alpha10$  es de hecho  $\beta1$ , se inmunoprecipitaron lisados de condrocitos con anticuerpos contra  $\alpha10$  o  $\beta1$  seguido por inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos contra la subunidad  $\beta1$ . Estos resultados demuestran claramente que  $\alpha10$  es un miembro de la familia de integrinas  $\beta1$ . Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que  $\alpha10$  se combine también con otras cadenas  $\beta$ .

Un anticuerpo peptídico policlonal generado contra el dominio citoplasmático de  $\alpha10$  precipitó dos bandas de proteínas con  $M_r$  de aproximadamente 160 kD ( $\alpha10$ ) y 125 kD ( $\beta1$ ) en condiciones reductoras. La inmunohistoquímica usando el anticuerpo frente a  $\alpha10$  mostró tinción de los condrocitos en secciones de tejido de cartílago articular humano. La tinción con anticuerpo era claramente específica puesto que la preincubación del anticuerpo con el péptido  $\alpha10$  suprimió completamente la tinción. La tinción inmunohistoquímica de secciones de extremidades de ratón a partir de tejido embrionario demostró que  $\alpha10$  se regula por incremento durante la condensación del mesénquima. Esto indica que la subunidad  $\alpha10$  de integrina es importante durante la formación de cartílago. En ratones de 3 días de edad, se encontró que  $\alpha10$  era la subunidad de integrina de unión a colágeno dominante, lo que apunta a que  $\alpha10$  tiene una función clave en el mantenimiento de las funciones del cartílago normal.

Estudios de expresión sobre el nivel de ARNm y proteína muestran que la distribución de  $\alpha10$  es bastante restrictiva. Análisis de inmunohistoquímica han mostrado que la subunidad de integrina  $\alpha10$  se expresa principalmente en cartílago aunque también se encuentra en pericondrio, periostio, surco de osificación de Ranvier, en la fascia que rodea al tendón y músculo esquelético y en estructuras similares a tendones en las válvulas cardiacas. Esta distribución apunta a que la subunidad de integrina  $\alpha10$  está presente también en fibroblastos y osteoblastos. La amplificación por PCR de ADNc a

partir de diferentes tipos de células reveló la presencia de una subunidad de integrina  $\alpha 10$  cortada y empalmada de manera alternativa. Esta  $\alpha 10$  cortada y empalmada era dominante en fibroblastos, lo que sugiere que  $\alpha 10$  en fibroblastos puede tener una función diferente en comparación con  $\alpha 10$  presente en condrocitos.

5 Se encontró que la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina disminuía cuando se cultivaban condrocitos en monocapa. En contraposición, se encontró que la expresión de  $\alpha 10$  aumentaba cuando se cultivaban las células en lechos de alginato. Puesto que se sabe que este último modelo de cultivo conserva el fenotipo de los condrocitos, los resultados sugieren que  $\alpha 10$  puede funcionar como marcador para un condrocito dife-  
10 renciado.

La adhesión entre tendones/ligamentos y el tejido circundante es un problema bien conocido tras infección, lesión y tras intervención quirúrgica. La adhesión entre el tendón y las vainas del tendón afecta a la función de deslizamiento y provoca problemas considerables especialmente durante la cicatrización de tendones en, por ejemplo, la mano  
15 y los dedos conduciendo a incapacidad funcional. La localización de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en la fascia del tendón y el músculo esquelético hace que  $\alpha 10$  sea una posible diana para fármacos y moléculas con propiedades antiadhesivas que podrían prevenir el deterioro de la función del tendón/ligamento. La subunidad  $\alpha 10$  de integrina también puede ser una diana para fármacos o moléculas con propiedades antiadhesi-  
20 vas en otros tejidos en los que la adhesión es un problema.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Purificación por afinidad de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  sobre colágeno tipo II-Sepharose.

#### Materiales y métodos

Se aislaron condrocitos bovinos, condrocitos humanos o células de condrosarcoma humanas tal como se describió anteriormente [Holmvald *et al*, Exp Cell Res, 221, 496-503 (1995), Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)]. Se aplicó un lisado en Triton X-100 de condrocitos bovinos a una precolumna de fibronectina-Sepharose seguido por  
30 una columna de colágeno tipo II-Sepharose y se eluyó la subunidad  $\alpha 10$  de integrina de la columna de colágeno tipo II mediante EDTA (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se precipitaron las proteínas eluidas mediante metanol/cloroformo, se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se tiñeron con azul de Coomassie. (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se aislaron péptidos de la  
35 banda de proteína  $\alpha 10$  mediante digestión en el gel con una tripsina y cromatografía en fase líquida y se secuenciaron mediante degradación de Edman (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)).

### Resultados

La figura 1 muestra las proteínas eluidas mediante EDTA de la columna de fibronectina-Sepharose (A), la fracción no retenida de la columna de colágeno tipo II-Sepharose (B) y las proteínas eluidas mediante EDTA de la columna de colágeno tipo II-Sepharose (C). La subunidad de integrina  $\alpha 10$  (160 kDa) que se eluyó específicamente de la columna de colágeno tipo II se indica con una flecha. La figura 2 muestra las se-

cuencias de aminoácidos de seis péptidos que se aislaron a partir de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina bovina. Las figuras 3 a, b y c muestran que la subunidad de integrina  $\alpha 10$  está presente en condrocitos bovinos (3a), condrocitos humanos (3b) y células de condrosarcoma humanas (3c). La afinidad por colágeno tipo II, la precipitación conjunta con la subunidad de integrina  $\beta 1$  y el peso molecular de 160 kDa en condiciones reductoras identifican la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en las diferentes células. Estos resultados muestran que  $\alpha 10$  puede aislarse a partir de condrocitos y a partir de células de condrosarcoma.

### Ejemplo 2

Amplificación de fragmento de PCR correspondiente a la subunidad de integrina  $\alpha 10$  bovina.

#### Materiales y métodos

Se usaron los cebadores degenerados GAY AAY ACI GCI CAR AC (DNTAQT, directo) y TIA TIS WRT GRT GIG GYT (EPHHSI, inverso) en PCR (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998) para amplificar la secuencia de nucleótidos correspondiente al péptido bovino 1 (figura 2). Se amplificó entonces un fragmento de PCR de 900 pb a partir de ADNc bovino usando un cebador específico interno TCA GCC TAC ATT CAG TAT (SAYIQY, directo) correspondiente a la secuencia de nucleótidos clonada del péptido 1 junto con el cebador degenerado ICK RTC CCA RTG ICC IGG (PGHWDR, inverso) correspondiente al péptido bovino 2 (figura 2). Se usaron bases mixtas en posiciones que estaban degeneradas dos veces y se usaron inosinas en posiciones que estaban degeneradas tres o cuatro veces. Se realizaron el aislamiento de ARNm y la síntesis de ADNc tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se clonó el fragmento purificado, se purificó y se secuenció tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)).

#### Resultados

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del péptido 1 (figura 2) mediante amplificación por PCR, clonación y secuenciación de ADNc bovino. A partir de esta secuencia de nucleótidos, se diseñó un cebador exacto y se aplicó en la amplificación por PCR con cebadores degenerados correspondientes a los péptidos 2-6 (figura 2). Cebadores correspondientes a los péptidos 1 y 2 amplificaron un fragmento de PCR de 900 pb a partir de ADNc bovino (figura 4).

### Ejemplo3

Clonación y análisis de secuencia de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  humana

#### Material y métodos

Se marcó con digoxigenina el fragmento de PCR de 900 pb clonado, correspondiente a integrina  $\alpha 10$ , según el kit de marcaje de ADN DIG (Boehringer Mannheim) y se usó como sonda para examinar una biblioteca de ADNc  $\lambda$ ZapII de condrocitos articulares humanos (proporcionada por Michael Bayliss, The Royal Veterinary Basic Sciences, Londres, RU) (52). Se rescataron clones positivos que contenían el plásmido pBluescript SK+ con el inserto de ADNc a partir del vector ZAP mediante corte *in vivo* tal como se describe en el kit de síntesis ZAP-ADNc<sup>®</sup> (Stratagene). Se purificaron plásmidos seleccionados y se secuenciaron tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC,

273, 20383-20389 (1998)) usando cebadores específicos T3, T7 e internos. Para obtener ADNc que codificaba para el extremo 5' de  $\alpha 10$ , se diseñó el cebador AAC TCG TCT TCC AGT GCC ATT CGT GGG (inverso; residuos 1254-1280 en ADNc de  $\alpha 10$ ) y se usó para la amplificación rápida del extremo 5' del ADNc (RACE) tal como se describe en el kit de amplificación de ADNc Marathon™ (Clontech INC., Palo Alto, CA).

### Resultados

Se aislaron dos clones solapantes, hc1 y hc2 (figura 5), se subclonaron y se secuenciaron. Estos clones contenían 2/3 de la secuencia de nucleótidos incluyendo el extremo 3' del ADNc. Se obtuvo un tercer clon (race1; figura 5), que contenía el extremo 5' del ADNc de  $\alpha 10$ , usando la técnica de RACE. A partir de estos tres clones solapantes de ADNc de  $\alpha 10$ , se secuenciaron 3884 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la figura 6. La secuencia contiene un marco de lectura abierto de 3504 nucleótidos que se pronostica que codifica para una proteína madura de 1167 aminoácidos. El sitio de escisión del péptido señal está marcado con una flecha, los homólogos humanos de secuencias de péptidos bovinos están subrayados y el dominio I está recuadrado. Se indican sitios de unión de ión metálico con un subrayado discontinuo, se indican sitios de N-glicosilación potenciales mediante un asterisco y el supuesto dominio transmembrana está doblemente subrayado. La secuencia citoplasmática conservada de manera normal se indica mediante un punto y un subrayado discontinuo punteado.

El análisis de secuencia demuestra que  $\alpha 10$  es un miembro de la familia de subunidades  $\alpha$  de integrinas.

### Ejemplo 4

Identificación de un clon que contiene una variante de corte y empalme de  $\alpha 10$

Un clon que se aisló a partir de la biblioteca de condrocitos humanos (véase el ejemplo 3) contenía una secuencia que era idéntica a la secuencia de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  excepto porque se delecionaron los nucleótidos entre las posiciones de nt 2942 y 3055. Se verificó la variante de corte y empalme de  $\alpha 10$  en experimentos de PCR usando cebadores que flanqueaban a la región de corte y empalme (véase la figura 14).

### Ejemplo 5

Identificación de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  mediante transferencia de tipo Northern

### Material y métodos

Se purificó ARNm de condrocitos bovinos usando un kit de purificación de ARNm QuickPrep®Micro (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), se separó en un gel de agarosa-formaldehído al 1%, se transfirió a membranas de nailon se inmovilizó mediante reticulación por UV. Se marcaron con  $^{32}P$  sondas de ADNc con el kit de marcaje de ADN Random Primed (Boehringer Mannheim). Se hibridaron previamente los filtros durante 2-4 horas a 42°C en 5x SSE, 5x disolución de Denhart, SDS al 0,1%, ADN de esmeralda de salmón 50  $\mu$ g/ml y formamida al 50% y entonces se hibridaron durante la noche a 42°C con la misma disolución que contenía la sonda específica (0,5-1 x 10<sup>6</sup>

cpm/ml). Se analizaron sondas de ADN específicamente unidas usando el sistema Phosphoimager (Fuji). Se separaron los filtros lavando en SDS al 0,1%, durante 1 hora a 80°C antes de volver a estudiar con sonda. Se aisló la sonda de ADNc de integrina  $\alpha 10$  a partir del plásmido que contenía *race1* usando las enzimas de restricción BamHI (GIBCO BRL) y NcoI (Boehringer Mannheim). La sonda de ARNc de integrina  $\beta$  de rata era un gentil regalo de Staffan Johansson, Uppsala, Suecia.

### Resultados

El análisis de transferencia de tipo Northern de ARNm de condrocitos bovinos mostró que una sonda de ADNc de  $\alpha 10$  humana se hibridaba con un único ARNm de aproximadamente 5,4 kb (figura 7). Como comparación, se usó una sonda de ADNc correspondiente a la subunidad  $\alpha 1$  de integrina. Esta sonda de ADNc se hibridaba con una banda de ARNm de aproximadamente 3,5 kb en el mismo filtro. Estos resultados muestran que puede usarse una sonda de ADNc contra  $\alpha 10$  para identificar la subunidad de integrina  $\alpha 10$  al nivel del ARNm.

### Ejemplo 6

Preparación de anticuerpos contra la subunidad  $\alpha 10$  de integrina

Se sintetizó un péptido correspondiente a parte del dominio citoplasmático de  $\alpha 10$ , Ckkipeeekreekle (véase la figura 6) y se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH). Se inmunizaron conejos con el conjugado de péptido-KLH para generar antisero contra la subunidad  $\alpha 10$  de integrina. Se purificaron por afinidad anticuerpos que reconocían  $\alpha 10$  en una columna con péptidos acoplados (Innovagen AB).

### Ejemplo 7

Inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina a partir de condrocitos

### Material y métodos

Se marcaron con  $^{125}\text{I}$  condrocitos humanos, se lisaron con Triton X-100 y se inmunoprecipitaron tal como se describió anteriormente (Holmvall *et al*, Exp Cell Res, 221, 496-503 (1995), Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se inmunoprecipitaron lisados en Triton X-100 de condrocitos humanos marcados con  $^{125}\text{I}$  con anticuerpos policlonales contra las subunidades de integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  o  $\alpha 10$ . Se separaron las proteínas inmunoprecipitadas mediante SDS-PAGE (4-12%) en condiciones no reductoras y se visualizaron usando un Phosphoimager. Se separaron lisados en Triton X-100 de condrocitos humanos inmunoprecipitados con  $\alpha 10$  o  $\beta 1$  mediante SDS-PAGE (8%) en condiciones no reductoras y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo policlonal frente a  $\beta 1$  y detección quimioluminiscente tal como se describió en Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998).

### Resultados

El anticuerpo peptídico policlonal, generado contra el dominio citoplasmático de  $\alpha 10$ , precipitó dos bandas de proteínas con  $M_r$  de aproximadamente 160 kD ( $\alpha 10$ ) y 125 kD ( $\beta 1$ ) en condiciones reductoras. La cadena  $\beta$  asociada a  $\alpha 10$  migró como la subunidad

de integrina  $\beta 1$  (figura 8a). Para verificar que la cadena  $\beta$  asociada a  $\alpha 10$  en condrocitos es de hecho  $\beta 1$ , se inmunoprecipitaron lisados de condrocitos con anticuerpos contra  $\alpha 10$  o  $\beta 1$  seguido por inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos contra la subunidad  $\beta 1$  (figura 8b). Estos resultados demuestran claramente que  $\alpha 10$  es un miembro de la familia de integrinas  $\beta 1$ . Sin embargo, los resultados no excluyen la posibilidad de que  $\alpha 10$  pueda asociarse con otras cadenas  $\beta$  en otras situaciones.

### Ejemplo 8

Tinción inmunohistoquímica de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina en cartílago humano y de ratón

#### Material y métodos

Se fijaron secciones congeladas de cartílago adulto (surco troclear) obtenidas durante cirugía (proporcionadas por Anders Lindahl, Salgrenska Hospital, Gotemburgo, Suecia) y secciones congeladas de extremidad de ratón de 3 días de edad y se prepararon para la inmunohistoquímica tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se analizó la expresión de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  usando el anticuerpo policlonal contra el dominio citoplasmático como anticuerpo primario (véase el ejemplo 6) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

#### Resultados

Las figuras 9 muestran la inmunotinción de cartílago articular adulto humano.

El anticuerpo frente a  $\alpha 10$  que reconoce el dominio citoplasmático de  $\alpha 10$  tiñó los condrocitos en secciones de tejido de cartílago articular humano (A). La tinción se redujo cuando el anticuerpo se preincubó con el péptido  $\alpha 10$  (B). Un anticuerpo de control que reconocía la subunidad de integrina  $\alpha 9$  no se unía al condrocito (C).

Las figuras 10 muestran que el anticuerpo frente a  $\alpha 10$  tiñe la mayoría de los condrocitos en el primordio óseo en crecimiento (a y b). El anticuerpo frente a  $\alpha 10$  también reconocía células en el surco de osificación de Ranvier (b), especialmente los osteoblastos en la corteza ósea que están revistiendo el cartílago en la metáfisis son altamente positivos para  $\alpha 10$ . Se cree que las células en la ranura de osificación de Ranvier son importantes para el crecimiento en diámetro del hueso. La subunidad  $\alpha 10$  de integrina se expresa también altamente en pericondrio y periostio. Probablemente, las células en estos tejidos son importantes en la reparación del tejido de cartílago. La localización descrita de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina sugiere que esta integrina es importante para la función del tejido de cartílago.

### Ejemplo 9

Tinción inmunohistoquímica de la subunidad  $\alpha 10$  de integrina durante el desarrollo del ratón

#### Material y métodos

Se investigaron secciones congeladas de embriones de ratón (13,5 días) para determinar la expresión de  $\alpha 10$  mediante inmunohistoquímica tal como se describe en Camper



*et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998). Se analizó la expresión de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  usando el anticuerpo policlonal contra el dominio citoplasmático como anticuerpo primario (véase el ejemplo 6) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Se investigaron también las secciones de embriones para determinar la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de integrina (anticuerpo monoclonal de Pharmingen) y colágeno tipo II (anticuerpo monoclonal, gentil regalo del Dr. John Mo, Lund University, Suecia).

### Resultados

La figura 11 muestra que la subunidad de integrina  $\alpha 10$  no está regulada en la extremidad cuando las células mesenquimatosas experimentan condensación para formar cartílago (a). Especialmente el borde del cartílago recién formado tiene alta expresión de  $\alpha 10$ . La formación de cartílago se verifica mediante la alta expresión del colágeno tipo II específico de cartílago (b). El anticuerpo de control contra la subunidad de integrina  $\alpha 1$  mostró sólo una débil expresión en el cartílago (c). En otros experimentos, se encontró expresión de  $\alpha 10$  en todos los tejidos que contenían cartílago en el ratón de 3 días de edad incluyendo extremidades, costillas y vértebras. La regulación por incremento de  $\alpha 10$  durante la formación de cartílago sugiere que esta subunidad de integrina es importante tanto en el desarrollo de cartílago y hueso como en la reparación de tejido de cartílago dañado.

### Ejemplo 10

Expresión de ARNm de  $\alpha 10$  en tejidos distintos de cartílago articular

#### Material y métodos

Se examinó la expresión de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  al nivel del ARNm en diferentes tejidos humanos. Se hibridó una transferencia de tipo Northern con ARNm inmovilizado a partir de los tejidos enumerados en la figura 12 con una sonda de ADNc de integrina  $\alpha 10$  aislada a partir del plásmido que contenía *race 1* usando las enzimas de restricción *BamH1* y *Nco1*. Se analizó el grado de hibridación usando un Phosphoimager. Los siguientes símbolos indican el nivel de ARNm en orden creciente: -, +, ++, +++, +++++.

#### Resultados

El análisis del ARNm hibridado mostró que  $\alpha 10$  se expresaba en aorta, tráquea, médula espinal, corazón, pulmón y riñón (figura 12). Todos los otros tejidos aparecían negativos para la expresión de  $\alpha 10$ . Estos resultados apuntan a una distribución restringida de la subunidad de integrina  $\alpha 10$ .

### Ejemplo 11

Tinción inmunohistoquímica de  $\alpha 10$  en fascia alrededor del tendón y músculo esquelético y en estructuras de tendón en válvulas cardiacas.

Materiales y métodos

Se fijaron secciones congeladas de cartílago adulto (surco troclear) obtenidas durante cirugía (proporcionadas por Anders Lindahl, Salgrenska Hospital, Gotemburgo, Suecia) y secciones congeladas de extremidad de ratón de 3 días de edad y se prepararon para la inmunohistoquímica tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)). Se analizó la expresión de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  usando el anticuerpo policlonal contra el dominio citoplasmático como anticuerpo primario (véase el ejemplo 6) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

Resultados

Tal como se muestra en las figuras 13, se encontró expresión de  $\alpha 10$  en la fascia que rodea al tendón (a) y músculo esquelético (b) y en las estructuras de tendón en las válvulas cardiacas (c). Esta localización sugiere que  $\alpha 10$  puede unirse a otras moléculas de la matriz además de al colágeno tipo II específico de cartílago. La localización de la integrina  $\alpha 10$  en la superficie de tendones indica que  $\alpha 10$  puede estar implicada en la adhesión no deseada que se produce a menudo entre tendones/ligamentos y el tejido circundante tras infección, lesión o tras cirugía.

Ejemplo 12

Expresión de ARNm de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en condrocitos, células endoteliales y fibroblastos.

Material y métodos

Se realizaron el aislamiento de ARNm, la síntesis de ADNc y la amplificación por PCR tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)).

Resultados

La figura 14 muestra la amplificación por PCR de ADNc de  $\alpha 10$  a partir de condrocitos articulares humanos (carriles A6 y B1), células endoteliales de vena umbilical humana (carril A2), fibroblastos humanos (carril A4) y tendón de ratón (figura 14b, carril B2). Los carriles 1, 3 y 5 en la figura 14A muestran fragmentos amplificados correspondientes a la subunidad  $\alpha 2$  de integrina en células endoteliales, fibroblastos y condrocitos, respectivamente. Se usaron cebadores de ADNc correspondientes a las posiciones en la secuencia de  $\alpha 10$  nt 2919-2943 (directo) y nt 3554-3578 (inverso) (véase la figura 6) para amplificar ADNc de  $\alpha 10$  a partir de diferentes células. La figura muestra que se amplificó  $\alpha 10$  en los tres tipos de células. Se amplificaron dos fragmentos de  $\alpha 10$  que representan la forma intacta de  $\alpha 10$  (fragmento más grande) y una variante de corte y empalme (fragmento más pequeño). El fragmento más grande era dominante en condrocitos mientras que el fragmento más pequeño estaba más pronunciado en tendón (B2).

Ejemplo 13

Construcción de un vector de expresión de mamíferos de  $\alpha 10$ .

Se insertó la secuencia codificante de proteína de longitud completa de  $\alpha 10$  (combinada a partir de 3 clones, véase la figura 6) en el vector de expresión de mamíferos

pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen). El vector contiene el promotor de SV40 y una secuencia de selección con zeocina. Se transfectó el vector de expresión que contiene  $\alpha 10$  en células que expresan la subunidad de integrina  $\beta 1$  pero que carecen de expresión de la subunidad  $\alpha 10$ . La expresión de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en la superficie celular puede analizarse mediante inmunoprecipitación y/o citometría de flujo usando anticuerpos específicos para  $\alpha 10$ . La capacidad de unión a ligando y la función de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  insertada pueden demostrarse en el experimento de adhesión celular y en experimentos de señalización.

#### Ejemplo 14

10 Construcción de un vector de expresión de mamíferos que contiene una variante de corte y empalme de  $\alpha 10$ .

Se insertó la secuencia codificante de proteína de longitud completa de  $\alpha 10$  (nt 2942-nt 3055 deletados) en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3 (véase el ejemplo 13). La expresión y función de la variante de corte y empalme puede analizarse tal como se describe en el ejemplo 13 y compararse con la subunidad de integrina  $\alpha 10$  intacta.

#### Ejemplo 15

20 Aislamiento parcial y caracterización del ADN genómico de integrina  $\alpha 10$

##### Material y métodos

Se marcó con  $^{32}\text{P}$  ADNc de  $\alpha 10$  humano, aislado a partir de plásmido que contiene *race1* usando las enzimas de restricción *Bam*HI (GIBCO BRL) y *Nco*I (Boehringer Mannheim), y se usó como sonda para examinar una biblioteca de cósmidos 129 de ratón (proporcionada por Reinhard Fässler, Lund University). Se aislaron clones positivos y se subclonaron. Se purificaron plásmidos seleccionados y se secuenciaron tal como se describió anteriormente (Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)) usando cebadores específicos T3, T7 e internos. Se construyeron entonces cebadores correspondientes a ADN genómico de ratón y se usaron en PCR para amplificar e identificar la secuencia genómica de  $\alpha 10$  a partir de los clones de cósmidos.

##### Resultados

La figura 15 muestra 7958 nt del gen de  $\alpha 10$ . Esta secuencia de ADN genómico parcial de la integrina  $\alpha 10$  contiene 8 exones y una secuencia Kozak. Se usó la secuencia de  $\alpha 10$  genómica de ratón para generar un vector de direccionamiento para experimentos de inactivación.

#### Ejemplo 16

Regulación por incremento de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  en condrocitos cultivados en lechos de alginato

40

Material y métodos

Se desprendieron condrocitos humanos cultivados en monocapa durante 2 semanas con tripsina-EDTA y se introdujeron en lechos de alginato. Se sabe que los condrocitos cultivados en alginato conservan su fenotipo mientras que condrocitos cultivados en monocapa se desdiferencian. Tras 11 días, se aislaron condrocitos cultivados o bien en alginato o bien en monocapa y se marcaron en la superficie con  $^{125}\text{I}$ . Entonces se inmunoprecipitó la subunidad de integrina  $\alpha 10$  con anticuerpos policlonales que reconocían el dominio citoplasmático de  $\alpha 10$  (véase el ejemplo 6 y Camper *et al*, JBC, 273, 20383-20389 (1998)).

Resultados

Tal como se muestra en la figura 16, condrocitos cultivados en lechos de alginato (carriles 3 y 4) regulaban por incremento su expresión de proteína de  $\alpha 10\beta 1$ . Esto estaba en contraposición a condrocitos cultivados en monocapa (carriles 1 y 2) que tenían una expresión muy baja de  $\alpha 10\beta 1$ . Se muestra la inmunoprecipitación con anticuerpo de control ac en los carriles 1 y 3. Se sabe que los condrocitos conservan su producción de matriz específica de cartílago en cultivos en alginato pero no en cultivos en monocapa, lo que apunta a que el alginato conserva el fenotipo de los condrocitos. Estos resultados apoyan que la subunidad de integrina  $\alpha 10$  puede usarse como marcador para condrocitos diferenciados.

Ejemplo 17

Inmunoprecipitación de la subunidad de integrina  $\alpha 10$  a partir de células de músculo liso humanas.

Material y métodos

Se aislaron células de músculo liso humanas de aorta humana. Tras una semana en cultivo, se marcaron las células con  $^{125}\text{I}$ , se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra la subunidad  $\beta 1$  de integrina (carril 1),  $\alpha 1$  (carril 2),  $\alpha 2$  (carril 3),  $\alpha 10$  (carril 4),  $\alpha 3$  (carril 5), control (carril 6) (figura 17). Se realizó el experimento tal como se describe en el ejemplo 7.

Resultados

El anticuerpo frente a  $\alpha 10$  precipitó dos bandas a partir de las células de músculo liso correspondientes a la subunidad de integrina  $\alpha 10$  y  $\beta 1$  (figura 17).

Ejemplo 18

Construcción de un vector de expresión bacteriano que contiene la secuencia para la región de corte y empalma de  $\alpha 10$ .

Se construyó un plásmido para la expresión intracelular en *E. coli* de la región cortada y empalmada de manera alternativa (pos. de aminoácido 952-986, SEQ. ID 1) tal como se describe. Se realizó la retrotraducción de la región cortada y empalmada de manera alternativa usando la tabla de codones de alta frecuencia de *E. coli*, creando una secuencia de ADNc del 96% de identidad con la secuencia original (SEQ. ID 1 pos. de

nucleótido 2940-3044). Usando extensión por solapamiento de secuencia (Horton *et al.*, Biotechniques 8:528, 1990), se usó el cebador  $\alpha 10$ pfor (tab. I) y  $\alpha 10$ prev (tab. I) para generar un fragmento bicatenario que codifica para la secuencia de aminoácidos de  $\alpha 10$ . Se usó este fragmento como molde de PCR con los cebadores  $\alpha 10$ pfor2 (tab. I) y  $\alpha 10$ prev2 (tab. I) con el fin de generar un sitio de enzimas de restricción para la subclonación en un vector pET que contenía el dominio Z de la proteína A de estafilococos, creando una fusión de la región cortada y empalmada de  $\alpha 10$  con el dominio la parte amino terminal del dominio Z encontrándose el sitio de escisión de trombina entremedias. Se muestra el fragmento generado en la segunda reacción de PCR (SEQ ID No. 3) indicando también las enzimas de restricción únicas usadas para la subclonación en el vector de expresión.

Tabla 1

$\alpha 10$ pfor	5' - G' TTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTGTTTCCGGTCTGATCATCTCCGC TCTGCTGCCGGCTGT-3'
$\alpha 10$ pfor2	5'-GGGGCATATGGTTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTG-3'
$\alpha 10$ prev	5' - GATAACCTGGGACAAGCTTAGGAAGTAGTTACCACCGTGAGCAACAG CCGGCAGCAGAGCGGA-3'
$\alpha 10$ prev2	5' - GGGGGGATCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGATAACCTGGGACAAGCTT AGGAAGT-3'

#### Bibliografía

1. Springer, T.A. (1990) Nature 346, 425-434
2. Ruoslahti, E. (1991) J.Clin.Invest. 87, 1-5
3. Hynes, R.O. (1992) Cell 69, 11-25
4. Hemler, M.E. (1988) Immunol.Today 9, 109-113
5. Yamada, K.M. (1991) J.Biol.Chem. 266, 12809-12812
6. Palmer, E.L., Ruegg, C., Ferrando, R., Pytela, R., and Sheppard, D. (1993) J.Cell Biol. 123, 1289-1297
7. Takada, Y., Elices, M.J., Crouse, C., and Hemler, M.E. (1989) EMBO J. 8, 1361-1368
8. Poncz, M., Eisman, R., Heidenreich, R., Silver, S.M., Vilaire, G., Surrey, S., Schwartz, E., and Bennett, J.S. (1987) J.Biol.Chem. 262, 8476-8482
9. Larson, R.S., Corbi, A.L., Berman, L., and Springer, T. (1989) J.Cell Biol. 108, 703-712
10. Corbi, A.L., Kishimoto, T.K., Miller, 'L.J., and Springer, T.A. (1988) J.Biol.Chem. 263, 12403-12411

11. Argraves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1987) *J.Cell Biol.* 105, 1183-1190.
12. Corbi, A.L., Miller, L.J., O'Connor, K., Larson, R.S., and Springer, T.A. (1987) *EMBO J.* 6, 4023-4028
- 5 13. Briesewitz, R., Epstein, M.R., and Marcantonio, E.E. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 2989-2996
14. Ziober, B.L., Vu, M.P., Waleh, N., Crawford, J., Lin, C.S., and Kramer, R.H. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 26773-26783
- 15 15. Hogervorst, F., Kuikman, I., van Kessel, A.G., and Sonnenberg, A. (1991) *Eur.J.Biochem.* 199, 425-433
16. Takada, Y. and Hemler, M.E. (1989) *J.Cell Biol.* 109, 397-407
17. Takada, Y., Murphy, E., Pil, P., Chen, C., Ginsberg, M.H., and Hemler, M.E. (1991) *J.Cell Biol.* 115, 257-266
18. Van der Vieren, M., Le Trong, H., Wood, C.L., Moore, P.F., St.John, T., Staunton, D.E., and Gallatin, W.M. (1995) *Immunity.* 3, 683-690
19. Schnapp, L.M., Breuss, J.M., Ramos, D.M., Sheppard, D., and Pytela, R. (1995) *J.Cell Sci.* 108, 537-544
20. Shaw, S.K., Cepek, K.L., Murphy, E.A., Russell, G.J., Brenner, M.B., and Parker, C.M. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 6016-6025
- 20 21. Suzuki, S., Argraves, W.S., Arai, H., Languino, L.R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 14080-14085
22. Ignatius, M.J., Large, T.H., Houde, M., Tawil, J.W., Barton, A., Esch, F., Carbonetto, S., and Reichardt, L.F. (1990) *J.Cell Biol.* 111, 709-720
- 25 23. Gullberg, D., Gehlsen, K.R., Turner, D.C., Åhlén, K., Zijenah, L.S., Barnes, M.J., and Rubin, K. (1992) *EMBO J.* 11, 3865-3873
24. Staa, W.D., Rajpara, S.M., Wayner, E.A., Carter, W.G., and Santoro, S.A. (1989) *J.Cell Biol.* 108, 1917-1924
25. Holmval, K., Camper, L., Johansson, S., Rubin, K., Kimura, J.H., and Lundgren-Åkelund, E. (1995) *Exp.Cell Res.* 221, 496-503
- 30 26. Forsberg, E., Ek, B., Engström, Å., and Johansson, S. (1994) *Exp.Cell Res.* 213, 183-190
27. Wayner, E.A. and Carter, W.G. (1987) *J.Cell Biol.* 105, 1873-1884
28. Weitzman, J.B., Pasqualini, R., Takada, Y., and Hemler, M.E. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 8651-8657
- 35 29. Elices, M.J. and Hemler, M.E. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86, 9906-9910
30. Languino, L.R., Colella, S., Zanetti, A., Andrieux, A., Ryckewaert, J.J., Charon, M.H., Marchisio, P.C., Plow, E.F., Ginsberg, M.H., Marguerie, G., and et al (1989) *Blood* 73, 734-742

31. Tuckwell, D.S., Humphries, M.J., and Brass, A. (1994) *Cell Adhes.Comm.* 2, 385-402
32. Springer, T.A. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 65-72
33. Colombatti, A., Bonaldo, P., and Doliana, R. (1993) *Matrix* 13, 297-306
- 5 34. Lee, C.H., Bradley, G., and Ling, V. (1995) *Cell Growth Differ.* 6, 347-354
35. Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., and Humphries, M.J. (1995) *Biochem.Soc.Trans.* 23, 504S
36. Kern, A., Eble, J., Golbik, R., and Kuhn, K. (1993) *Eur.J.Biochem.* 215, 151-159
37. Tuckwell, D.S., Reid, K.B., Barnes, M.J., and Humphries, M.J. (1996)  
10 *Eur.J.Biochem.* 241, 732-739
38. Kamata, T. and Takada, Y. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 26006-26010
39. Dürr, J., Goodman, S., Potocnik, A., von der Mark, H., and von der Mark, K. (1993) *Exp.Cell Res.* 207, 235-244
40. Salter, D.M., Hughes, D.E., Simpson, R., and Gardner, D.L. (1992) *Br.J.Rheumatol.*  
15 31, 231-234
41. Woods, V.L.J., Schreck, P.J., Gesink, D.S., Pacheco, H.O., Amiel, D., Akeson, W.H., and Lotz, M. (1994) *Arthritis Rheum.* 37, 537-544
42. Camper, L., Heinegård, D., and Lundgren-Åkerlund, E. (1997) *J.Cell Biol* 138, 1159-1167
- 20 43. Hemler, M.E., Sanchez Madrid, F., Flotte, T.J., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., Bhan, A.K., Springer, T.A., and Strominger, J.L. (1984) *J.Immunol.* 132, 3011-3018
44. Bottger, B.A., Hedin, U., Johansson, S., and Thyberg, J. (1989) *Differentiation.* 41, 158-167
45. Sommarin, Y. and Heinegård, D. (1983) *Biochem.J.* 214, 777-784
- 25 46. Häuselmann, H.J., Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L., Kuettner, K.E., Gitelis, S.H., and Thonar, E.J.M.A. (1992) *Matrix* 12, 116-129
47. Miller, E.J. (1972) *Biochemistry* 11, 4903-4909
48. Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) *Anal.Biochem.* 138, 141-143
49. Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) *J.Cell Biol.* 67, 835-851
- 30 50. Hellman, U. (1997) in *Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing* (Kamp, R.M., Choli-Papadopoulou, T., and Wittmann-Liebold, B., eds) pp. 97-104, Springer-Verlag, Heidelberg
51. Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W., and Moncada, S. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 11419-11423
- 35 52. Tuckwell, D.S., Brass, A., and Humphries, M.J. (1992) *Biochem.J.* 285, 325-331
53. Dedhar, S. and Hannigan, G.E. (1996) *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, 657-669

54. Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 12411-12417
55. Puzon McLaughlin, W., Yednock, T.A., and Takada, Y. (1996) *J.Biol.Chem.* 271, 16580-16585
- 5 56. O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1994) *J.Cell Biol.* 124, 1047-1059
57. De Melker, A.A., Kramer, D., Kuikman, I., and Sonnenberg, A. (1997) *Biochem J* 529-537
- 10 58. Rojiani, M.V., Finlay, B.B., Gray, V., and Dedhar, S. (1991) *Biochemistry* 30, 9859-9866
59. Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demaurex, N., Grinstein, S., St Arnaud, R., and Dedhar, S. (1997) *Nature* 386, 843-847
60. Hynes, R.O. (1992) *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2, 621-624
61. Santoro, S.A. (1986) *Cell* 46, 913-920
- 15 62. Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1989) *J.Cell Biol.* 109, 2455-2462
63. Yokosaki, Y., Monis, H., Chen, J., and Sheppard, D. (1996) *J.Biol.Chem.* 271, 24144-24150



Lista de secuencias

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3884 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico y aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(E) ORGANISMO: ser humano

(F) TIPO DE CÉLULA: condrocito

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO. 1:

ES 2 396 693 T3

```

CAGGTCAGAAACCGATCAGGCATGGAACCTCCCCTTCGTCACCTCACCTGTTCTTGCCCCTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTCCAGTCTTTGGCTAGTCCGTACCTTGAGGGGAAGCAGTGAGTGGACAAGAACGGGGAC

          M E L P F V T H L F L P L -

GTGTTCTCTGACAGGTCTCTGCTCCCCCTTTAACCTGGATGAACATCACCCACGCCTATTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
CACAAGGACTGTCCAGAGACGAGGGGAAATTTGGACCTACTTGTAGTGGGTGCGGATAAG

          V F L T G L C S P F N L D E H H P R L F -

CCAGGGCCACCAGAAGCTGAATTTGGATACAGTGTCTTACAACATGTTGGGGGTGGACAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGTCCCAGTGGTCTTCGACTTAAACCTATGTACAGAAATGTTGTACAACCCCCACCTGTC

          P G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q -

CGATGGATGCTGGTGGGCGCCCCCTGGGATGGGCCTTCAGGCGACCGGAGGGGGGACGTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
GCTACCTACGACCACCCGCGGGGACCCTACCCGGAAGTCCGCTGGCCTCCCCCTGCAA

          R W M L V G A P W D G P S G D R R G D V -

TATCGCTGCCCTGTAGGGGGGGCCACAATGCCCATGTGCCAAGGGCCACTTAGGTGAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATAGCGACGGGACATCCCCCGGGTGTACGGGTACACGGTCCCGGTGAATCCACTG

          Y R C P V G G A H N A P C A K G H L G D -

TACCAACTGGGAAATTCATCTCATCTGCTGTGAATATGCACCTGGGGATGTCTCTGTTA
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
ATGGTTGACCCTTTAAGTAGAGTAGGACGACACTTATACGTGGACCCCTACAGAGACAAT

          Y Q L G N S S H P A V N M H L G M S L L -

GAGACAGATGGTGATGGGGGATTCATGGCCTGTGCCCTCTCTGGTCTCGTGCTTGTGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTCTGTCTACCACTACCCCTAAGTACCGGACACGGGAGAGACCAGAGCACGAACACCG

          E T D G D G G F M A C A P L W S R A C G -

```

```

AGCTCTGTCTTCAGTTCTGGGATATGTGCCCGTGTGGATGCTTCATTCCAGCCTCAGGGA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCGAGACAGAAGTCAAGACCCTATACACGGGCACACCTACGAAGTAAGGTCGGAGTCCCT

S S V F S S G I C A R V D A S F Q P Q G -

AGCCTGGCACCCACTGCCCAACGCTGCCAACATACATGGATGTTGTCATTGTCTTGGAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCGGACCGTGGGTGACGGGTTGCGACGGGTTGTATGTACCTACAACAGTAACAGAACCTA

S L A P T A Q R C P T Y M D V V I V L D -

GGCTCCAACAGCATCTACCCCTGGTCTGAAGTTCAGACCTTCTACGAAGACTGGTAGGG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CCGAGGTTGTCTAGATGGGGACCAGACTTCAAGTCTGGAAGGATGCTTCTGACCATCCC

G S N S I Y P W S E V Q T F L R R L V G -

AAACTGTTTATTGACCCAGAACAGATACAGGTGGGACTGGTACAGTATGGGGAGAGCCCT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TTTGACAAATAACTGGGTCTTGTCTATGTCCACCCTGACCATGTCATACCCTCTCGGGA

K L F I D P E Q I Q V G L V Q Y G E S P -

GTACATGAGTGGTCCCTGGGAGATTTCCGAACGAAGGAAGAAGTGGTGAGAGCAGCAAAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CATGTACTIONACCAGGGACCCTCTAAAGGCTTGCTTCCCTTCTTACCCTCTCGTCTGTTT

V H E W S L G D F R T K E E V V R A A K -

AACCTCAGTCGGCGGGAGGGACGAGAAACAAAGACTGCCCAAGCAATAATGGTGGCCTGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TTGGAGTCAGCCGCCCTCCCTGCTCTTTGTTTCTGACGGGTTTCGTTATTACCACCGGACG

N L S R R E G R E T K T A Q A I M V A C -

ACAGAAGGGTTCAGTCAGTCCCATGGGGGCCGACCCGAGGCTGCCAGGCTACTGGTGGTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TGTCTTCCCAAGTCAGTCAGGGTACCCCGGCTGGGCTCCGACGGTCCGATGACCACCAA

T E G F S Q S H G G R P E A A R L L V V -

GTCACTGATGGAGAGTCCCATGATGGAGAGGAGCTTCCCTGCAGCACTAAAGGCCTGTGAG
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CAGTGACTACCTCTCAGGGTACTACCTCTCCTCGAAGGACGTCGTGATTCGGGACACTC

V T D G E S H D G E E L P A A L K A C E -

GCTGGAAGAGTGACACGCTATGGGATGTCAGTCCCTGGTCACTACCTCCGGCGGCAGCGA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGACCTTCTACTGTGCGATACCCTAACGTCAGGAACCAGTGATGGAGGCCGCCGTCGCT

A G R V T R Y G I A V L G H Y L R R Q R -

GATCCCAGCTCTTTCCTGAGAGAAATTAGAACTATTGCCAGTGATCCAGATGAGCGATTC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CTAGGGTTCGAGAAAGGACTCTCTTAACTCTTGATAACGGTCACTAGGTCTACTCGCTAAG

D P S S F L R E I R T I A S D P D E R F -

TTCTTCAATGTCACAGATGAGGCTGCTCTGACTGACATTGTGGATGCACTAGGAGATCGG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
AAGAAGTTACAGTGTCTACTCCGACGAGACTGACTGTAACACCTACGTGATCCTCTAGCC

F F N V T D E A A L T D I V D A L G D R -

```

ES 2 396 693 T3

ATTTTGGCCTTGAAGGGTCCCATGCAGAAAACGAAAGCTCCTTTGGGCTGGAAATGTCT  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 TAAAAACCGGAACCTCCAGGGTACGTCTTTTGTCTTCGAGGAAACCCGACCTTTACAGA  
 I F G L E G S H A E N E S S F G L E M S -  
 CAGATTGGTTTCTCCACTCATCGGCTAAAGGATGGGATTCTTTTGGGATGGTGGGGGCC  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
 GTCTAACCAAAGAGGTGAGTAGCCGATTTCCTACCCTAAGAAAACCTACCACCCCGG  
 Q I G F S T H R L K D G I L F G M V G A -  
 TATGACTGGGGAGGCTCTGTGCTATGGCTTGAAGGAGGCCACCGCCTTTTCCCCCACGA  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 AATACTGACCCCTCCGAGACACGATACCGAATTTCCTCCGGTGGCGGAAAAGGGGGGTGCT  
 Y D W G G S V L W L E G G H R L F P P R -  
 ATGGCACTGGAAGACGAGTTCCCCCTGCACTGCAGAACCATGCAGCCTACCTGGGTTAC  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 TACCGTGACCTTCTGCTCAAGGGGGACGTGACGTCTTGGTACGTCCGATGGACCCAATG  
 M A L E D E F P P A L Q N H A A Y L G Y -  
 TCTGTTTCTTCCATGCTTTTGCGGGGTGGACGCCCTGTTTCTCTCTGGGGCTCCTCGA  
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
 AGACAAAGAAGGTACGAAAACGCCCCACCTGCGGCGGACAAAGAGAGACCCCGAGGAGCT  
 S V S S M L L R G G R R L F L S G A P R -  
 TTTAGACATCGAGGAAAAGTCATCGCCTTCCAGCTTAAGAAAGATGGGGCTGTGAGGGTT  
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
 AAATCTGTAGCTCCTTTTCAGTAGCGGAAGGTGCAATTCTTTCTACCCCGACACTCCCAA  
 F R H R G K V I A F Q L K K D G A V R V -  
 GCCCAGAGCCTCCAGGGGGAGCAGATTGGTTCATACTTTGGCAGTGAGCTCTGCCCATTG  
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 CGGGTCTCGGAGGTCCCCCTCGTCTAACCAAGTATGAAACCGTCACTCGAGACGGGTAAC  
 A Q S L Q G E Q I G S Y F G S E L C P L -  
 GATACAGATAGGGATGGAACAACCTGATGTCTTACTTGTGGCTGCCCCATGTTCTGGGA  
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 CTATGTCTATCCCTACCTTGTGACTACAGAATGAACACCGACGGGGGTACAAGGACCCT  
 D T D R D G T T D V L L V A A P M F L G -  
 CCCCAGAACAAGGAAACAGGACGTGTTTATGTGTATCTGGTAGGCCAGCAGTCCTTGCTG  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 GGGGTCTTGTTCCTTTGTCCTGCACAAATACACATAGACCATCCGGTCTCAGGAACGAC  
 P Q N K E T G R V Y V Y L V G Q Q S L L -  
 ACCCTCCAAGGAACACTTCCAGCCAGAACCCCCCAGGATGCTCGGTTTGGCTTTGCCATG  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 TGGGAGGTTTCTTGTGAAGTCGGTCTTGGGGGGTCTACGAGCCAAACCGAAACGGTAC  
 T L Q G T L Q P E P P Q D A R F G F A M -  
 GGAGCTCTTCTGATCTGAACCAAGATGGTTTTGCTGATGTGGCTGTGGGGGCGCCTCTG  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 CCTCGAGAAGGACTAGACTTGGTTCTACAAAACGACTACACCGACACCCCGCGGAGAC  
 G A L P D L N Q D G F A D V A V G A P L -

ES 2 396 693 T3

GAAGATGGGCACCAGGGAGCACTGTACCTGTACCATGGAACCCAGAGTGGAGTCAGGCC  
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
 CTTCTACCCGTGGTCCCTCGTGACATGGACATGGTACCTTGGGTCTCACCTCAGTCCGGG  
 E D G H Q G A L Y L Y H G T Q S G V R P -  
 CATCCTGCCCAGAGGATTGCTGCTGCCTCCATGCCACATGCCCTCAGCTACTTTGGCCGA  
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
 GTAGGACGGGTCTCCTAACGACGACGGAGGTACGGTGTACGGGAGTCGATGAAACCGGCT  
 H P A Q R I A A A S M P H A L S Y F G R -  
 AGTGTGGATGGTCCGCTAGATCTGGATGGAGATGATCTGGTTCGATGTGGCTGTGGGTGCC  
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
 TCACACCTACCAGCCGATCTAGACCTACCTCTACTAGACCAGCTACACCGACACCCACGG  
 S V D G R L D L D G D D L V D V A V G A -  
 CAGGGGCAGCCATCCTGCTCAGCTCCCGGCCATTGTCCATCTGACCCCATCACTGGAG  
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
 GTCCCCCGTCCGTAGGACGAGTCGAGGGCCGGTAACAGGTAGACTGGGGTAGTGACCTC  
 Q G A A I L L S S R P I V H L T P S L E -  
 GTGACCCACAGGCCATCAGTGTGGTTCAGAGGGACTGTAGGCGCGAGGCCAAGAAGCA  
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
 CACTGGGGTGTCCGGTAGTCACACCAAGTCTCCCTGACATCCGCCCTCCGGTTCTTCGT  
 V T P Q A I S V V Q R D C R R R G Q E A -  
 GTCTGTCTGACTGCAGCCCTTTGCTTCCAAGTGACCTCCCGTACTCCTGGTCGCTGGGAT  
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100  
 CAGACAGACTGACGTCGGGAAACGAAGTTCACTGGAGGGCATGAGGACCAGCGACCCTA  
 V C L T A A L C F Q V T S R T P G R W D -  
 CACCAATTCTACATGAGGTTCCACGCATCACTGGATGAATGGACTGCTGGGGCACGTGCA  
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160  
 GTGGTTAAGATGTACTCCAAGTGGCGTAGTGACCTACTTACCTGACGACCCCGTGCACGT  
 H Q F Y M R F T A S L D E W T A G A R A -  
 GCATTTGATGGCTCTGGCCAGAGGTTGTCCCTCGGAGGCTCCGGCTCAGTGTGGGGAAT  
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220  
 CGTAAACTACCGAGACCGGTCTCCAACAGGGGAGCCTCCGAGGCCGAGTCACACCCCTTA  
 A F D G S G Q R L S P R R L R L S V G N -  
 GTCACTTGTGAGCAGCTACACTTCCATGTGCTGGATACATCAGATTACCTCCGGCCAGTG  
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280  
 CAGTGAACACTCGTCGATGTGAAGGTACACGACCTATGTAGTCTAATGGAGGCCGGTCCAC  
 V T C E Q L H F H V L D T S D Y L R P V -  
 GCCTTGACTGTGACCTTTGCCTTGGACAATACTACAAAGCCAGGGCCTGTGCTGAATGAG  
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340  
 CGGAACTGACACTGGAAACGGAACCTGTTATGATGTTTCGGTCCCGGACACGACTTACTC  
 A L T V T F A L D N T T K P G P V L N E -  
 GGCTACCCACCTCTATACAAAAGCTGGTCCCTTCTCAAAGGATTGTGGCCCTGACAAT  
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400  
 CCGAGTGGGTGGAGATATGTTTTCGACCAGGGGAAGAGTTTCCTAACACCGGGACTGTTA  
 G S P T S I Q K L V P F S K D C G P D N -

GAATGTGTCACAGACCTGGTGCTTCAAGTGAATATGGACATCAGAGGCTCCAGGAAGGCC  
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460  
 CTTACACAGTGTCTGGACCACGAAGTTCACCTTATACCTGTAGTCTCCGAGGTCCTCCGG  
  
 E C V T D L V L Q V N M D I R G S R K A -  
  
 CCATTTGTGGTTCGAGGTGGCCGGCGGAAAGTGTGGTATCTACAACCTCTGGAGAACAGA  
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520  
 GGTAACACCAAGCTCCACCGGCCGCTTTCACGACCATAGATGTTGAGACCTCTTGTCT  
  
 P F V V R G G R R K V L V S T T L E N R -  
  
 AAGGAAAATGCTTACAATACGAGCCTGAGTATCATCTTCTCTAGAAAACCTCCACCTGGCC  
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580  
 TTCCTTTTACGAATGTTATGCTCGGACTCATAGTAGAAGAGATCTTGGAGGTGGACCGG  
  
 K E N A Y N T S L S I I F S R N L H L A -  
  
 AGTCTCACTCCTCAGAGAGAGAGCCCAATAAAGGTGGAATGTGCCGCCCTTCTGCTCAT  
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640  
 TCAGAGTGAGGAGTCTCTCTCTCGGGTTATTTCCACCTTACACGGCGGGAAGACGAGTA  
  
 S L T P Q R E S P I K V E C A A P S A H -  
  
 GCCCGGCTCTGCAGTGTGGGGCATCCTGTCTTCCAGACTGGAGCCAAGGTGACCTTTCTG  
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700  
 CGGGCCGAGACGTCACACCCCGTAGGACAGAAGGTCTGACCTCGGTTCCACTGGAAAGAC  
  
 A R L C S V G H P V F Q T G A K V T F L -  
  
 CTAGAGTTGAGTTAGCTGCTCCTCTCTCCTGAGCCAGGTCTTTGGGAAGCTGACTGCC  
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760  
 GATCTCAAACCTCAAATCGACGAGGAGAGAGACTCGGTCCAGAAAACCTTCGACTGACGG  
  
 L E F E F S C S S L L S Q V F G K L T A -  
  
 AGCAGTGACAGCCTGGAGAGAAATGGCACCCTTCAAGAAAACACAGCCCAGACCTCAGCC  
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820  
 TCGTCACTGTCTGGACCTCTCTTTACCGTGGGAAGTTCTTTTGTGTCGGGTCTGGAGTCGG  
  
 S S D S L E R N G T L Q E N T A Q T S A -  
  
 TACATCCAATATGAGCCCCACCTCCTGTTCTCTAGTGAGTCTACCCTGCACCGCTATGAG  
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880  
 ATGTAGGTTATACTCGGGGTGGAGGACAAGAGATCACTCAGATGGGACGTGGCGATACTC  
  
 Y I Q Y E P H L L F S S E S T L H R Y E -  
  
 GTTCACCCATATGGGACCCTCCCAGTGGGTCTGGCCCAGAATTCAAAACCACTCTCAGG  
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940  
 CAAGTGGGTATACCCTGGGAGGGTCACCCAGGACCGGCTTAAGTTTGGTGAGAGTCC  
  
 V H P Y G T L P V G P G P E F K T T L R -  
  
 GTTCAGAACCTAGGCTGCTATGTGGTCACTGGCCTCATCATCTCAGCCCTCCTCCAGCT  
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000  
 CAAGTCTTGGATCCGACGATACACAGTACCCGAGTAGTAGAGTCGGGAGGAAGGTCCA  
  
 V Q N L G C Y V V S G L I I S A L L P A -  
  
 GTGGCCCATGGGGCAATTACTTCTATCACTGTCTCAAGTCATCACTAACAATGCAAGC  
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060  
 CACCGGTTACCCCGTTAATGAAGGATAGTGACAGAGTTCAGTAGTGATTGTTACGTTCCG  
  
 V A H G G N Y F L S L S Q V I T N N A S -

ES 2 396 693 T3

TGCATAGTGCAGAACCTGACTGAACCCCCAGGCCACCTGTGCATCCAGAGGAGCTTCAA  
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120  
 ACGTATCACGTCTTGGACTGACTTGGGGTCCGGGTGGACACGTAGGTCTCCTCGAAGTT  
  
 C I V Q N L T E P P G P P V H P E E L Q -  
  
 CACACAAACAGACTGAATGGGAGCAATACTCAGTGTGAGGTGGTGGAGGTGCCACCTTGGG  
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180  
 GTGTGTTTGTCTGACTTACCCTCGTTATGAGTCACAGTCCACCACTCCACGGTGAACCC  
  
 H T N R L N G S N T Q C Q V V R C H L G -  
  
 CAGCTGGCAAAGGGGACTGAGGTCTCTGTTGGACTATTGAGGCTGGTTCACAATGAATTT  
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240  
 GTCGACCGTTTCCCCTGACTCCAGAGACAACCTGATAACTCCGACCAAGTGTACTTAAA  
  
 Q L A K G T E V S V G L L R L V H N E F -  
  
 TTCCGAAGAGCCAAGTTCAAGTCCCTGACGGTGGTCAGCACCTTTGAGCTGGGAACCGAA  
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300  
 AAGGCTTCTCGGTTCAAGTTCAGGGACTGCCACCAGTCGTGGAAACTCGACCCTTGGCTT  
  
 F R R A K F K S L T V V S T F E L G T E -  
  
 GAGGGCAGTGTCTACAGCTGACTGAAGCCTCCCCTGGAGTGAGAGCCTCTTGGAGGTG  
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360  
 CTCCCGTCACAGGATGTCGACTGACTTCGGAGGGCAACCTCACTCTCGGAGAACCTCCAC  
  
 E G S V L Q L T E A S R W S E S L L E V -  
  
 GTTCAGACCCGGCCTATCCTCATCTCCCTGTGGATCCTCATAGGCAGTGTCTGGGAGGG  
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420  
 CAAGTCTGGGCCGGATAGGAGTAGAGGGACACCTAGGAGTATCCGTCACAGGACCTCCC  
  
 V Q T R P I L I S L W I L I G S V L G G -  
  
 TTGCTCCTGCTTGCTCTCCTTGTCTTCTGCCTGTGGAAGCTTGGCTTCTTTGCCATAAG  
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480  
 AACGAGGACGAACGAGAGGAACAGAAGACGGACACCTTCGAACCGAAGAAACGGGTATTC  
  
 L L L L A L L V F C L W K L G F F A H K -  
  
 AAAATCCCTGAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGTTGGAGCAATGAATGTAGAATAAGGGT  
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540  
 TTTTAGGGACTCCTTCTTTTCTCTTCTTCAACCTCGTTACTTACATCTTATTCCCA  
  
 K I P E E E K R E E K L E Q  
  
 CTAGAAAGTCCCTCCCTGGCAGCTTTCTTCAAGAGACTTGCATAAAAGCAGAGGTTTGGGG  
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600  
 GATCTTTCAGGAGGGACCGTCGAAAGAAGTTCTCTGAACGTATTTTCGTCTCAAACCCC  
  
 GCTCAGATGGGACAAGAAGCCGCCTCTGGACTATCTCCCCAGACCAGCAGCCTGACTTGA  
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660  
 CGAGTCTACCCTGTTCTTCGGCGGAGACCTGATAGAGGGGTCTGGTTCGTGCGACTGAACT  
  
 CTTTGTAGTCTAGGGATGCTGCTGGCTAGAGATGAGGCTTTACCTCAGACAAGAAGAGC  
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720  
 GAAACTCAGGATCCCTACGACGACCGATCTACTCCGAAATGGAGTCTGTTCTTCTCG

3721 TGGCACCAAAACTAGCCATGCTCCCACCCTCTGCTTCCCTCCTCCTCGTGATCCTGGTTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780  
 ACCGTGGTTTTGATCGGTACGAGGGTGGGAGACGAAGGGAGGAGGAGCACTAGGACCAAG

3781 CATAGCCAACACTGGGGCTTTTGTGGGGTCTTTTATCCCCAGGAATCAATAATTTT  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840  
 GTATCGGTTGTGACCCCGAAAACAAACCCAGGAAAATAGGGGTCCTTAGTTATTAAAAA

3841 TTGCCTAGGAAAAAAAAAAGCGGCCGCGAATTCGATATCAAGCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 3884  
 AACGGATCCTTTTTTTTTTCGCCGCGCTTAAGCTATAGTTCGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3779 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico y aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (E)

(i) TIPO MOLECULAR: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (E) ORGANISMO: ser humano
- (F) TIPO DE CÉLULA: condrocito

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO. 2:



ES 2 396 693 T3

```

CAGGTCAGAAACCGATCAGGCATGGAACCTCCCCTTCGTCACTCACCTGTTCTTGCCCCTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTCCAGTCTTTGGCTAGTCCGTACCTTGAGGGGAAGCAGTGAGTGGACAAGAACGGGGAC

                M E L P F V T H L F L P L -

GTGTTCTGACAGGTCTCTGCTCCCCCTTAACTGGATGAACATCACCCACGCCTATTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CACAAGGACTGTCCAGAGACGAGGGGAAATTTGGACCTACTTGTAGTGGGTGCGGATAAG

V F L T G L C S P F N L D E H H P R L F -

CCAGGGCCACCAGAAGCTGAATTTGGATACAGTGTCTTACAACATGTTGGGGGTGGACAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGTCCCCTGGTCTTCTGACTTAACTATGTCACAGAATGTTGTACAACCCCCACCTGTC

P G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q -

CGATGGATGCTGGTGGGCGCCCCCTGGGATGGGCCTTCAGGCGACCGGAGGGGGGACGTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GCTACCTACGACCACCCGCGGGGACCCCTACCCGGAAGTCCGCTGGCCTCCCCCTGCAA

R W M L V G A P W D G P S G D R R G D V -

TATCGCTGCCCTGTAGGGGGGGCCACAATGCCCATGTGCCAAGGGCCACTTAGGTGAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATAGCGACGGGACATCCCCCGGGTGTACGGGTACACGGTCCCGGTGAATCCACTG

Y R C P V G G A H N A P C A K G H L G D -

TACCAACTGGGAAATTCATCTCATCTGCTGTGAATATGCACCTGGGGATGTCTCTGTTA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ATGGTTGACCCTTTAAGTAGAGTAGGACGACACTTATACGTGGACCCCTACAGAGACAAT

Y Q L G N S S H P A V N M H L G M S L L -

GAGACAGATGGTGATGGGGGATTCATGGCCTGTGCCCTCTCTGGTCTCGTGCTTGTGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTCTGTCTACCACTACCCCTAAGTACCGGACACGGGGAGAGACCAGAGCACGAACACCG

E T D G D G G F M A C A P L W S R A C G -

AGCTCTGTCTTCAGTTCTGGGATATGTGCCCGTGTGGATGCTTCATTCAGCCTCAGGGA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCGAGACAGAAGTCAAGACCTATACACGGGCACACCTACGAAGTAAGGTCGGAGTCCCT

```

ES 2 396 693 T3

S S V F S S G I C A R V D A S F Q P Q G -  
 AGCCTGGCACCCACTGCCCAACGCTGCCAACATACATGGATGTTGTCATTGTCTTGGAT  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540  
 TCGGACCGTGGGTGACGGGTTGCGACGGGTTGTATGTACCTACAACAGTAACAGAACCTA  
 S L A P T A Q R C P T Y M D V V I V L D -  
 GGCTCCAACAGCATCTACCCCTGGTCTGAA<sup>g</sup>TTTCAGACCTTCTTACGAAGACTGGTAGGG  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 CCGAGGTTGTCGTAGATGGGGACCAGACTTCAAGTCTGGAAGGATGCTTCTGACCATCCC  
 G S N S I Y P W S E V Q T F L R R L V G -  
 AACTGTTTATTGACCCAGAACAGATACAGGTGGGACTGGTACAGTATGGGGAGAGCCCT  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 TTTGACAAATAACTGGGTCTTGTCTATGTCCACCCTGACCATGTCATACCCCTCTCGGGA  
 K L F I D P E Q I Q V G L V Q Y G E S P -  
 GTACATGAGTGGTCCCTGGGAGATTTCCGAACGAAGGAAGAAGTGGTGAGAGCAGCAAAG  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 CATGTACTCACCAGGACCCTCTAAAGGCTTGCTTCTTCTTACCACCTCTCGTCGTTTTC  
 V H E W S L G D F R T K E E V V R A A K -  
 AACCTCAGTCGGCGGGAGGGACGAGAAACAAAGACTGCCCAAGCAATAATGGTGGCCTGC  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 TTGGAGTCAGCCGCCCTCCCTGCTCTTTGTTTCTGACGGGTTTCGTTATTACCACCGGACG  
 N L S R R E G R E T K T A Q A I M V A C -  
 ACAGAAGGGTTCAGTCAGTCCCATGGGGGCCGACCCGAGGCTGCCAGGCTACTGGTGGTT  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 TGCTTCCCAAGTCAGTCAGGGTACCCCGG .TGGGCTCCGACGGTCCGATGACCACCAA  
 T E G F S Q S H G G R P E A A R L L V V -  
 GTCACTGATGGAGAGTCCCATGATGGAGAGGAGCTTCTTGCAGCACTAAAGGCCCTGTGAG  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 CAGTACTACCTCTCAGGGTACTACCTCTCCTCGAAGGACGTCGTGATTTCCGGACTC  
 V T D G E S H D G E E L P A A L K A C E -  
 GCTGGAAGAGTGACACGCTATGGGATTCAGTCC<sup>g</sup>TGGTCACTACCTCCGGCGGCAGCGA  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 CGACCTTCTCACTGTGCGATACCCTAACGTCAGGAACCAGTGATGGAGGCCGCCGTCGCT  
 A G R V T R Y G I A V L G H Y L R R Q R -  
 GATCCCAGCTCTTCTGAGAGAAATTAGAACTATTGCCAGTGATCCAGATGAGCGATTC  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
 CTAGGGTTCGAGAAAGGACTCTCTTTAATCTTGATAACGGTCACTAGGTCTACTCGCTAAG  
 D P S S F L R E I R T I A S D P D E R F -  
 TTCTCAATGTCACAGATGAGGCTGCTCTGACTGACATTGTGGATGCACTAGGAGATCGG  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
 AAGAAGTTACAGTGTCTACTCCGACGAGACTGACTGTAACACCTACGTGATCCTCTAGCC  
 F F N V T D E A A L T D I V D A L G D R -  
 ATTTTTGGCCTTGAAGGGTCCCATGCAGAAAACGAAAGCTCCTTTGGGCTGGAAATGTCT  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 TAAAAACCGAACTTCCAGGGTACGTCTTTTGTCTTCGAGGAAACCCGACCTTTACAGA

ES 2 396 693 T3

I F G L E G S H A E N E S S F G L E M S -  
 CAGATTGGTTTCTCCACTCATCGGCTAAAGGATGGGATTCTTTTTGGGATGGTGGGGGCC  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
 GTCTAACCAAAGAGGTGAGTAGCCGATTTCTACCCTAAGAAAACCCCTACCACCCCGG  
 Q I G F S T H R L K D G I L F G M V G A -  
 TATGACTGGGGAGGCTCTGTGCTATGGCTTGAAGGAGGCCACCGCCTTTCCCCCACGA  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 ATACTGACCCCTCCGAGACACGATACCGAACTTCTCCGGTGGCGGAAAAGGGGGGTGCT  
 Y D W G G S V L W L E G G H R L F P P R -  
 ATGGCACTGGAAGACGAGTTCCCCCTGCACTGCAGAACCATGCAGCCTACCTGGGTTAC  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 TACCGTGACCTTCTGCTCAAGGGGGGACGTGACGTCTTGGTACGTCCGATGGACCCAATG  
 M A L E D E F P P A L Q N H A A Y L G Y -  
 TCTGTTTCTTCCATGCTTTTGGGGGTGGACGCCCTGTTTCTCTCTGGGGCTCCTCGA  
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
 AGACAAAGAAGGTACGAAAACGCCCCACCTGCGGGGACAAAGAGAGACCCCGAGGAGCT  
 S V S S M L L R G G R R L F L S G A P R -  
 TTTAGACATCGAGGAAAAGTCATCGCCTTCCAGCTTAAGAAAGATGGGGCTGTGAGGGTT  
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
 AAATCTGTAGCTCCTTTTCAGTAGCGGAAGGTGCAATTCTTTCTACCCCGACACTCCCAA  
 F R H R G K V I A F Q L K K D G A V R V -  
 GCCCAGAGCCTCCAGGGGAGCAGATTGGTTTACTTTGGCAGTGAGCTCTGCCATTG  
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 CGGGTCTCGGAGGTCCCTCTGCTAACCAAGTATGAAACCGTCTCTCGAGACGGGTAAC  
 A Q S L Q G E Q I G S Y F G S E L C P L -  
 GATACAGATAGGGATGGAACAACCTGATGTCTTACTTGTGGCTGCCCCCATGTTTCTGGGA  
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 CTATGTCTATCCCTACCTTGTGACTACAGAATGAACACCGACGGGGGTACAAGGACCCT  
 D T D R D G T T D V L L V A A P M F L G -  
 CCCCAGAACAAGGAAACAGGACGTGTTTATGTGTATCTGGTAGGCCAGCAGTCCTTGCTG  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 GGGGCTTGTTCCTTTGCTCCTGCACAAATACACATAGACCATCCGGTCTGAGGAACGAC  
 P Q N K E T G R V Y V Y L V G Q Q S L L -  
 ACCCTCAAGGAACACTTACGCCAGAACCCCCCAGGATGCTCGGTTTGGCTTTGCCATG  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 TGGGAGGTTTCTTGTGAAGTCGGTCTGGGGGGTCTACGAGCCAAACCGAAACGGTAC  
 T L Q G T L Q P E P P Q D A R F G F A M -  
 GGAGCTCTTCTGATCTGAACCAAGATGGTTTTGCTGATGTGGCTGTGGGGGCGCCTCTG  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 CCTCGAGAAGGACTAGACTTGGTTCTACCAAACGACTACACCGACACCCCGCGGAGAC  
 G A L P D L N Q D G F A D V A V G A P L -  
 GAAGATGGGCACCAGGGAGCACTGTACCTGTACCATGGAACCCAGAGTGGAGTCAGGCC  
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
 CTTCTACCCGTGGTCCCTCGTGACATGGACATGGTACCTTGGGTCTCACCTCAGTCCGGG

ES 2 396 693 T3

E D G H Q G A L Y L Y H G T Q S G V R P -  
 1801 CATCCTGCCAGAGGATGCTGCTGCCTCCATGCCACATGCCCTCAGCTACTTTGGCCGA 1860  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTAGGACGGGTCTCCTAACGACGACGGAGGTACGGTGTACGGGAGTCGATGAAACCGGCT  
 H P A Q R I A A A S M P H A L S Y F G R -  
 1861 AGTGTGGATGGTCGGCTAGATCTGGATGGAGATGATCTGGTCGATGTGGCTGTGGGTGCC 1920  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCACACCTACCAGCCGATCTAGACCTACCTCTACTAGACCAGCTACACCGACACCCACGG  
 S V D G R L D L D G D D L V D V A V G A -  
 1921 CAGGGGGCAGCCATCCTGCTCAGCTCCCGGCCATTTGCCATCTGACCCCATCACTGGAG 1980  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTCCCCCGTCGGTAGGACGAGTCGAGGGCCGGTAACAGGTAGACTGGGGTAGTGACCTC  
 Q G A A I L L S S R P I V H L T P S L E -  
 1981 GTGACCCACAGGCCATCAGTGTGGTTCAGAGGGACTGTAGGGCGGAGGCCAAGAAGCA 2040  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CACTGGGGTGTCCGGTAGTCACACCAAGTCTCCCTGACATCCGCGCTCCGGTTCTTCGT  
 V T P Q A I S V V Q R D C R R R G Q E A -  
 2041 GTCTGTCTGACTGCAGCCCTTTGCTTCCAAGTGACCTCCCGTACTCCTGGTCGCTGGGAT 2100  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGACAGACTGACGTCGGGAAACGAAGTTCACTGGAGGGCATGAGGACCAGCGACCCTA  
 V C L T A A L C F Q V T S R T P G R W D -  
 2101 CACCAATTCTACATGAGGTTACCGCATCACTGGATGAATGGACTGCTGGGGCACGTGCA 2160  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTGGTTAAGATGTACTCCAAGTGGCGTAGTGACCTACTTACCTGACGACCCCGTGCACCT  
 H Q F Y M R F T A S L D E W T A G A R A -  
 2161 GCATTTGATGGCTCTGGCCAGAGTTGTCCCTCGGAGGCTCCGGCTCAGTGTGGGGAAT 2220  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGTAAACTACCGAGACCGGTCTCCAACAGGGGAGCCTCCGAGGCCGAGTCACACCCCTTA  
 A F D G S G Q R L S P R R L R L S V G N -  
 2221 GTCACTGTGAGCAGCTACACTTCCATGTGCTGGATACATCAGATTACCTCCGGCCAGTG 2280  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGTGAACACTCGTCGATGTGAAGGTACACGACCTATGTAGTCTAATGGAGGCCGGTCAC  
 V T C E Q L H F H V L D T S D Y L R P V -  
 2281 GCCTTGACTGTGACCTTTGCCTTGGACAATACTACAAAGCCAGGGCCTGTGCTGAATGAG 2340  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGGAACTGACACTGGAAACGGAACCTGTTATGATGTTTCGGTCCCGGACACGACTTACTC  
 A L T V T F A L D N T T K P G P V L N E -  
 2341 GGCTCACCCACCTCTATACAAAAGCTGGTCCCTTCTCAAAGGATTGTGGCCCTGACAAT 2400  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCGAGTGGGTGGAGATATGTTTTCGACCAGGGGAAGAGTTTCTAACACCGGGACTGTTA  
 G S P T S I Q K L V P F S K D C G P D N -  
 2401 GAATGTGTCACAGACCTGGTGCTTCAAGTGAATATGGACATCAGAGGCTCCAGGAAGGCC 2460  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTTACACAGTGTCTGGACCACGAAGTTCACCTTATACCTGTAGTCTCCGAGGTCTTCCGG

ES 2 396 693 T3

E C V T D L V L Q V N M D I R G S R K A -  
 2461 CCATTTGTGGTTCGAGGTGGCCGGCAAAGTGCTGGTATCTACAACCTCTGGAGAACAGA 2520  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGTAACACCAAGCTCCACCGCCGCTTTCACGACCATAGATGTTGAGACCTCTTGTCT  
 P F V V R G G R R K V L V S T T L E N R -  
 2521 AAGGAAAATGCTTACAATACGAGCCTGAGTATCATCTTCTCTAGAAACCTCCACCTGGCC 2580  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTCCTTTTACGAATGTTATGCTCGGACTCATAGTAGAAGAGATCTTTGGAGGTGGACCGG  
 K E N A Y N T S L S I I F S R N L H L A -  
 2581 AGTCTCACTCCTCAGAGAGAGAGCCCAATAAAGGTGGAATGTGCCGCCCTTCTGCTCAT 2640  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCAGAGTGAGGAGTCTCTCTCTCGGTTATTTCCACCTTACACGGCGGGGAAGACGAGTA  
 S L T P Q R E S P I K V E C A A P S A H -  
 2641 GCCCGGCTCTGCAGTGTGGGGCATCCTGTCTTCCAGACTGGAGCCAAGGTGACCTTTCTG 2700  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGGGCCGAGACGTCACACCCCGTAGGACAGAAGGTCTGACCTCGGTTCCACTGGAAAGAC  
 A R L C S V G H P V F Q T G A K V T F L -  
 2701 CTAGAGTTTGTAGTTTAGCTGCTCCTCTCTCCTGAGCCAGGTCTTTGGGAAGCTGACTGCC 2760  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GATCTCAAACCTCAAATCGACGAGGAGAGAGGACTCGGTCCAGAAACCCTTCGACTGACGG  
 L E F E F S C S S L L S Q V F G K L T A -  
 2761 AGCAGTGACAGCCTGGAGAGAAATGGCACCCCTCAAGAAAACACAGCCCAGACCTCAGCC 2820  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGTCACTGTCTCGGACCTCTCTTTACCGTGGGAAGTTCTTTTGTGTCGGGTCTGGAGTCGG  
 S S D S L E R N G T L Q E N T A Q T S A -  
 2821 TACATCCAATATGAGCCCCACCTCCTGTTCTCTAGTGAGTCTACCCTGCACCGCTATGAG 2880  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ATGTAGGTTATACTCGGGTGGAGGACAAGAGATCACTCAGATGGGACGTGGCGATACTC  
 Y I Q Y E P H L L F S S E S T L H R Y E -  
 2881 GTTCACCCATATGGGACCTCCCAGTGGTCTCGGCCAGAATTCAAACCCTCTCAGG 2940  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAAGTGGGTATACCCTGGGAGGGTCACCCAGGACCGGTCTTAAGTTTTGGTGAGAGTCC  
 V H P Y G T L P V G P G P E F K T T L R -  
 2941 ACTAACAATGCAAGCTGCATAGTGCAGAACCTGACTGAACCCCCAGGCCACCTGTGCAT 3000  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGATTGTTACGTTTCGACGTATCACGTCTTGGACTGACTTGGGGTCCGGGTGGACACGTA  
 T N N A S C I V Q N L T E P P G P P V H -  
 3001 CCAGAGGAGCTTCAACACACAAACAGACTGAATGGGAGCAATACTCAGTGTCAGGTGGTG 3060  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGTCTCCTCGAAGTTGTGTGTTTGTCTGACTTACCCTCGTTATGAGTACAGTCCACCAC  
 P E E L Q H T N R L N G S N T Q C Q V V -  
 3061 AGGTGCCACCTTGGGCAGCTGGCAAAGGGGACTGAGGTCTCTGTTGGACTATTGAGGCTG 3120  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCCACGGTGAACCCGTCGACCGTTTCCCTGACTCCAGAGACAACCTGATAACTCCGAC

ES 2 396 693 T3

R C H L G Q L A K G T E V S V G L L R L -  
 3121 GTTCACAATGAATTTTTCCGAAGAGCCAAGTTCAGTCCCTGACGGTGGTCAGCACCTTT 3180  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAAGTGTTACTTAAAAAGGCTTCTCGGTTCAAGTTCAGGGACTGCCACCAGTCGTGGAAA  
 V H N E F F R R A K F K S L T V V S T F -  
 3181 GAGCTGGGAACCGAAGAGGGCAGTGTCTACAGCTGACTGAAGCCTCCCCTGGAGTGAG 3240  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTCGACCCTTGGCTTCTCCCGTCACAGGATGTCGACTGACTTCGGAGGGCAACCTCACTC  
 E L G T E E G S V L Q L T E A S R W S E -  
 3241 AGCCTCTTGGAGGTGGTTCAGACCCGGCCTATCCTCATCTCCCTGTGGATCCTCATAGGC 3300  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGGAGAACCTCCACCAAGTCTGGGCCGGATAGGAGTAGAGGGACACCTAGGAGTATCCG  
 S L L E V V Q T R P I L I S L W I L I G -  
 3301 AGTGTCTTGGGAGGGTTGCTCCTGCTTGTCTCTCTTGTCTTCTGCCTGTGGAAGCTTGGC 3360  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCACAGGACCCTCCAACGAGGACGAACGAGAGGAACAGAAGACGGACACCTTCGAACCG  
 S V L G G L L L L A L L V F C L W K L G -  
 3361 TTCTTTGCCATAAGAAAATCCCTGAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGTTGGAGCAATGA 3420  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAGAAACGGGTATTCTTTTAGGGACTCCTTCTTTTTTCTCTTCTTCAACCTCGTTACT  
 F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q  
 3421 ATGTAGAATAAGGGTCTAGAAAGTCCCTCCCTGGCAGCTTTCTTCAAGAGACTTGCATAAA 3480  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TACATCTTATTCCAGATCTTTCAGGAGGGACCGTCGAAAGAAGTTCTCTGAACGTATTT  
 AGCAGAGGTTTGGGGGCTCAGATGGGACAAGAAGCCGCTCTGGACTATCTCCCCAGACC  
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540  
 TCGTCTCAAACCCCGAGTCTACCCTGTTCTCGGCGGAGACCTGATAGAGGGGTCTGG  
 AGCAGCCTGACTTGACTTTTGTAGTCTAGGGATGCTGCTGGCTAGAGATGAGGCTTTACC  
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600  
 TCGTGGGACTGAACTGAAAACCTCAGGATCCCTACGACGACCGATCTTACTCCGAAATGG  
 TCAGACAAGAAGAGCTGGCACCAAAACTAGCCATGCTCCCACCCTCTGCTTCCCTCCTCC  
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660  
 AGTCTGTTCTTCTCGACCGTGGTTTTGATCGGTACGAGGTGGGAGACGAAGGGAGGAGG  
 TCGTGATCCTGGTTCATAGCCAACACTGGGGCTTTTGTGGGGTCTTTTATCCCCAG  
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720  
 AGCACTAGGACCAAGGTATCGGTTGTGACCCGAAAAACAAACCCAGGAAAATAGGGGTC  
 GAATCAATAATTTTTTTCCTAGGAAAAAAAAGCGGCCGGAATTCGATATCAAGCT  
 3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3779  
 CTTAGTTATTAATAAACGGATCCTTTTTTTTTTCGCCGGCGCTTAAGCTATAGTTCGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 143 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico y aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(iii) TIPO MOLECULAR: ADNc

5 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(E) ORGANISMO: ser humano

(F) TIPO DE CÉLULA: condrocito

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO. 3:

```

      NdeI
      |
GGGGCATATGGTTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTGTTTCCGGTCTGATCATCTCCGCTCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      CCCCGTATACCAAGTCTTGGACCCAACGATGCAACAAAGGCCAGACTAGTAGAGGCGAGA

b      G H M V Q N L G C Y V V S G L I I S A L -

      GCTGCCGGCTGTTGCTCACGGTGGTAACTACTTCCTAAGCTTGTCACAGGTTATCAGCGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CGACGGCCGACAACGAGTGCCACCATTGATGAAGGATTCGAACAGGGTCCAATAGTCGCC

b      L P A V A H G G N Y F L S L S Q V I S G -

      BamHI
      |
CCTGGTGCCGCGCGGATCCCCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 143
      GGACCACGGCGCGCCTAGGGGGG

b      L V P R G S P -
    
```

## REIVINDICACIONES

1. Subunidad  $\alpha$ 10 de integrina de unión a colágeno aislada o recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1, o una variante de corte y empalme de la misma, o un fragmento de la misma
- 5 en la que:
  - la variante de corte y empalme comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2; y el fragmento se selecciona del grupo que consiste en fragmentos que comprenden la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, fragmentos que comprenden la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido n.º 952 hasta el aminoácido
  - 10 n.º 986 de SEQ ID No. 1 y fragmentos que comprenden la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido n.º 140 hasta el aminoácido n.º 337 de SEQ ID No. 1.
2. Subunidad  $\alpha$ 10 de integrina, según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1.
3. Variante de corte y empalme según la reivindicación 1.
- 15 4. Variante de corte y empalme según la reivindicación 3, consistiendo la variante de corte y empalme en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 2.
5. Fragmento según la reivindicación 1.
6. Fragmento según la reivindicación 5, comprendiendo el fragmento la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ.
- 20 7. Fragmento según la reivindicación 5, comprendiendo el fragmento la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido n.º 952 hasta el aminoácido n.º 986 de SEQ ID No. 1.
8. Fragmento según la reivindicación 5, comprendiendo el fragmento la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido n.º 140 hasta el aminoácido n.º 337 de SEQ ID
- 25 No. 1.
9. Polinucleótido aislado que codifica para una subunidad  $\alpha$ 10 de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Polinucleótido aislado según la reivindicación 9, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 ó 2.
- 30 11. Vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.
12. Célula que comprende un vector según la reivindicación 11.
13. Procedimiento para producir una subunidad  $\alpha$ 10 de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, procedimiento que comprende las etapas de:
  - (a) aislar un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10;
  - (b) construir un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado;



(c) transformar una célula huésped con dicho vector de expresión; y

(d) cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para la expresión de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina de unión a colágeno, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende además la etapa (e) de aislar la subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento a partir de dicha célula huésped transformada o medio de cultivo.

15. Heterodímero de integrina aislado o recombinante que comprende una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una subunidad  $\beta$ .

16. Heterodímero de integrina según la reivindicación 15, en el que la subunidad  $\beta$  es  $\beta 1$ .

17. Procedimiento para producir un heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16, procedimiento que comprende las etapas de:

(a) aislar un primer polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 y un segundo polinucleótido que codifica para una subunidad  $\beta$ ;

(b) construir uno o más vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos primero y segundo;

(c) transformar una célula huésped con dicho(s) vector(es) de expresión; y

(d) cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para la expresión de un heterodímero de integrina.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la subunidad  $\beta$  es  $\beta 1$ .

19. Procedimiento según la reivindicación 17 ó 18, que comprende además la etapa (e) de aislar el heterodímero de integrina a partir de dicha célula huésped transformada o medio de cultivo.

20. Célula que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica para una subunidad  $\beta$ .

21. Célula según la reivindicación 20, en la que la subunidad  $\beta$  es  $\beta 1$ .

22. Entidad de unión que tiene la capacidad de unirse específicamente a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID no. 1, o a una variante de corte y empalme de la misma mostrada en SEQ ID no. 2, o a un fragmento de la misma

en la que:

el fragmento se selecciona del grupo que consiste en fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ, fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido n.º 952 hasta el aminoácido n.º 986 de SEQ ID no. 1 y fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos des-

de el aminoácido n.º 140 hasta el aminoácido n.º 337 de SEQ ID no. 1, y siendo la entidad de unión un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

23. Entidad de unión según la reivindicación 22, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 24. Composición farmacéutica que comprende una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, un heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16 o una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23.

10 25. Composición farmacéutica según la reivindicación 24, siendo la composición una composición de vacuna.

26. Subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en medicina.

15 27. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, para su uso en medicina.

28. Heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16, para su uso en medicina.

29. Entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23, para su uso en medicina.

20 30. Uso de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, un heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16 o una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23 en la preparación de un agente de diagnóstico para detectar células o tejidos que expresan dicha subunidad  $\alpha 10$  de integrina.

25 31. Uso de una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23 en la preparación de un medicamento para seleccionar como diana moléculas de células o tejidos durante estados patológicos que comprenden daño de cartílago, traumatismo, cáncer, artritis reumatoide, inflamación u osteoartritis.

30 32. Uso según la reivindicación 30, en el que el agente de diagnóstico comprende una composición farmacéutica según la reivindicación 24 ó 25.

33. Uso según la reivindicación 30 ó 31, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en condrocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y fibroblastos.

35 34. Uso según la reivindicación 30, para determinar el estado de diferenciación de las células.

35 35. Uso de una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23 *in vitro* para detectar la formación de cartílago.

36. Uso de una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23 *in vitro* para determinar el estado de diferenciación de las células.

37. Uso de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16 o una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23 *in vitro* para selección, análisis, clasificación, aislamiento o purificación de condrocitos.
- 5 38. Uso de una subunidad  $\alpha 10$  de integrina, variante de corte y empalme o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un heterodímero de integrina según la reivindicación 15 ó 16 *in vitro* para identificar entidades que se unen a dicha subunidad  $\alpha 10$  de integrina.
- 10 39. Método para estimular, inhibir o bloquear la formación de cartílago o hueso *in vitro* que comprende tratamiento con una entidad de unión según la reivindicación 22 ó 23.

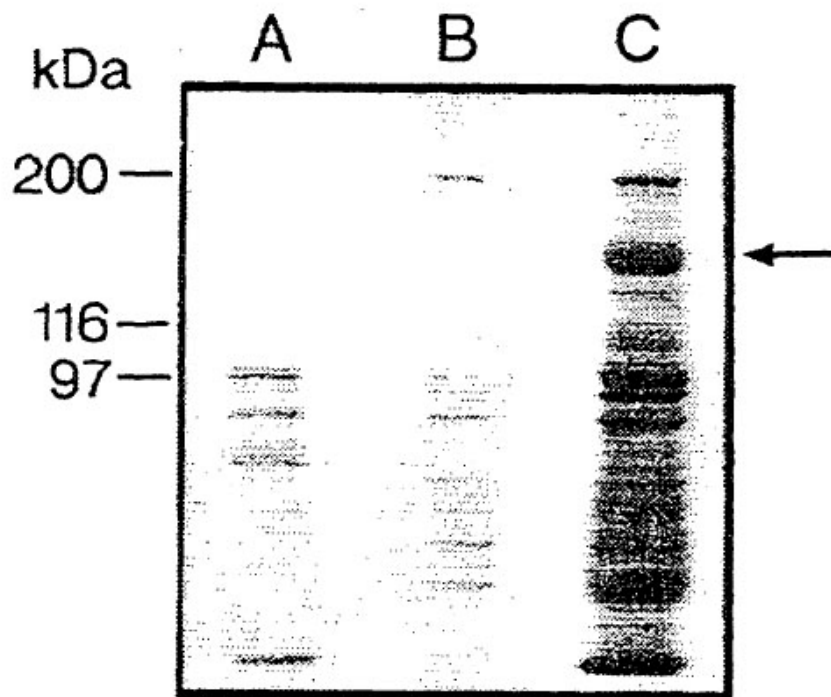


FIGURA 1

---

Péptido	secuencia de aminoácidos
1	DNTAQTSAYIQYEPHHSI
2	GPGHWDR
3	AAFDGSGQR
4	FAMGALPD
5	FTASLDEWTTAAR
6	VDASFRPQGXLAP

---

FIGURA 2

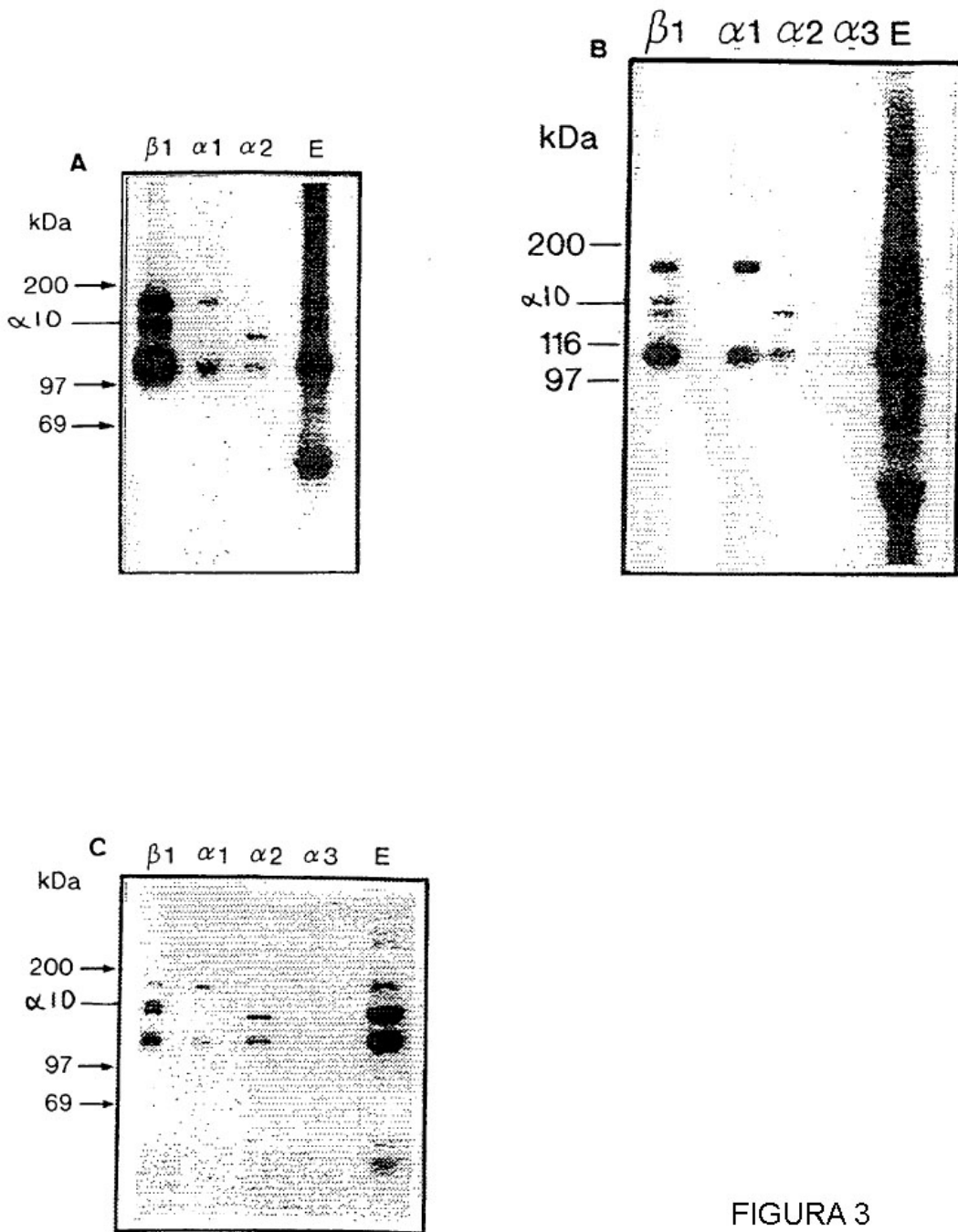


FIGURA 3

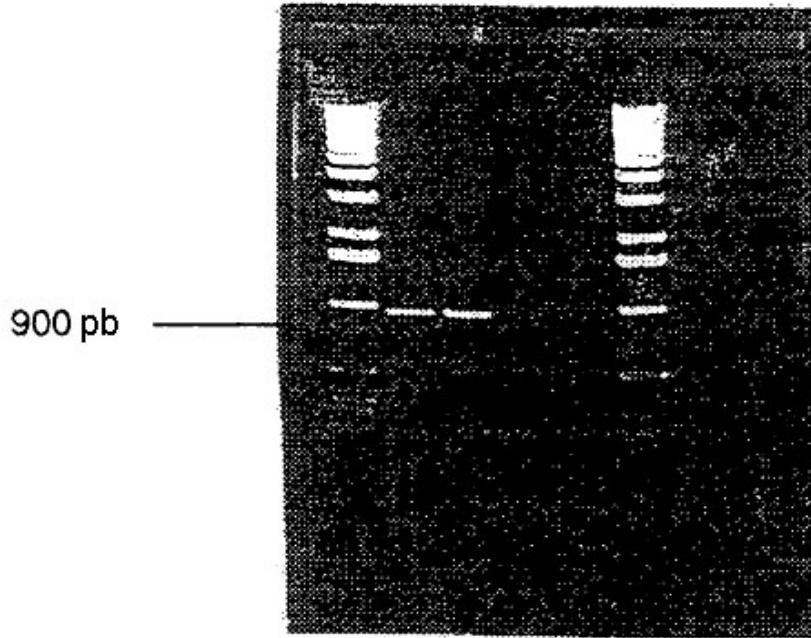


FIGURA 4

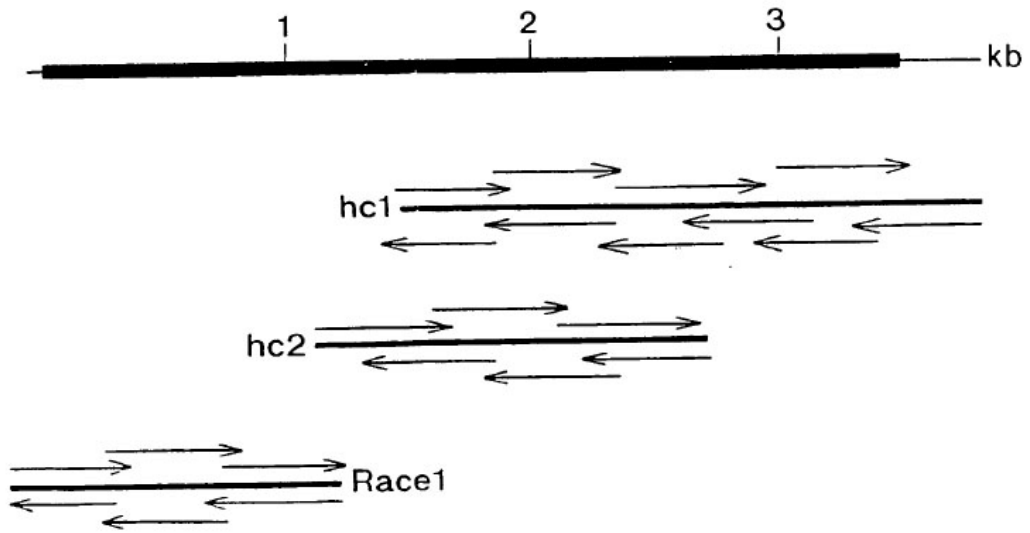


FIGURA 5



CAGTGCAGAACCCGATCAGGATGAACTCCCTTCTGCTACTCCTCTCTCCCTGGTCTCTGACA HELPPVTHLFLPLVFLY -6	72	CCTCTGCCCCAGAGATGCTGCTGCCCTGATGCCACATGCCCTGAGCTACTTTGGCCAGTGTGGATGT HPAQRIAAAASHMPHALSYFCR3VDDG	1872
GGTCTCTGCCCTTTTACCTGGATGACATCACCCACGCTATTCGACGGCCACGAGAGCTGAAFTT GLCSPTFWLEDENHPRLEFPFPPEAEF 19	144	CGGCTAGATGATGGATGAGATGATCTGGTGGATGTGGCTGTGGTGGCCAGGGGGAGCCATCTCTCTACG RLDLDGGDDLVVDVAVGAQGGAAILLS 619	1944
GGATACAGTCTCTACACATGTTGGGGTGGACAGCGATGATGCTGGTGGCCCTGGATGGGCT GYSVLQNVCGGQRMHLVCPAMDGP 43	216	TCCGGCCATTTCTCACTGACCCCACTGAGGAGTCCACAGGCCATCACTGTGTGAGAGGAC SRPIVHLTPPSLEVTPOAISVQRD 643	2016
TGAGCGACCGAGGGGGAGCTTATCTGCTGCCCTGAGGGGGCCACAAATGCCCATGTGCAGGGC SGDRRGDGYRCPVYGGGAHNAPCAKG 67	288	TGTAGCGCGAGCCCAAGAGTCTGCTGACTGACGCCCTTGTCTCAAGTGTCCCTACTCTCT CRRRGQEAVALYLAALCFQVTSRT 667	2088
CAGTGGTACACACCTGGGAATCTCTCACTCTGTGTGATGACCTGGGGATCTCTGTGTA HLGDTQLGNSSHPAVRHRHLGMSLL 91	360	GGTCCCTGGATCACCAATTTCACTAGGTTACCGCATCACTGGATGATGATGCTGTGGACGCTCA CRWHDHQFYHRFFTA3LQEW2AGARA 691	2104
GAGACAGTGGTGGGGGTTCAATGCCCTGTGCCCTCTGTCTCTGCTGTGTGGAGCTCTCTCTC ETDGDGCGFHACAPLWSRACGSSVF 115	432	GCATTTGATGCTCTGGCCAGAGTTCTCCCTCGGAGGCTCCGGCTCAOTGTGGGAACTGACTGTGAG AFDCSGORLSRRLRLSLVCHVTC 715	2232
AGTCTGGGATGATGCTGGATGCTCTATTCAGCTCAGGAGGCTGGCCACTCTCCAGCC SSGICARVDA3FQPGGSLAFTAOR 139	504	CAGCTACACTTCATGTCTGTGATACATGATACCTCCGCGAGTGGCTTCACTGTCTCTCTCTG QLHFFHVLDTSOYLRPVALTFFAL 739	2304
TGCCACATAGTGGTGTCTGATCTGTGGATGCTCAGCAGATTAACCTGTGTGTGAAGTTGAG CPTYNADVIVLDGGSMSIYPWSRVQ 163	576	GACATACCTAAGCCAGCCGCTGTGTGAATGAGGGCTCACCCACTATACAAAGCTGTGTCTCTC DHTTKFGPVLNHEGSPSTSIKLVFT 763	2376
ACCTCTACGAAGCTGGTAGGAACTTATTATGACCGAAGCAGATACAGTGGAGTGTAGAT RFLRLVGLKLFIDPEQIQVGLVQY 848	648	TCAAGGATCTGGCTGACATGAATGCTGACAGCTGCTGCTCAAGTANTAGACATGAGG SKDCGPGDMCECVTDLVLOVWHDIR 787	2448
GGGAGAGCTGTGATCTGATGCTGGAGTTCGAGCAATGCGAAGCAAGTGTGACAGCAGCAG GESPVHESVSLGDFRTKEEVVBAK 920	720	TCCAGGAGCCCATTTGTGTCTGAGTGGCCGGGGGAACTGGTATACAAAGCTGTGTCTCTC SRKAPFVVRGGRBRKVLVSTLEMR 811	2520
AACCTACTGCGGGGGAGGAGAACAAAGCTCCCAAGCAATATGCTGGCTCAGCAGAGGTTTC RLSRRREGCTKTAAQAINHVACTEGF 992	792	AAGGAAATGCTTACAAATGAGCTGAGTACTCTCTCTAGAACTCCAGCTGGAGTCTACTCTCT KENAYHTSLSIIIFSRMLHLSLTP 835	2592
AGTCACTCCATGGGGCCGACCCAGCCGAGCCAGCTACTGGTGTCTCTACTGATGAGAGTCCATGAT SOSHGGRRPEAARLLVVTDDGESHND 1064	864	CAGAGAGAGCCCAATAGGCTGAAATGCGCCCTCTGCTGAGCCGCTGTGATGGGGAT QRESPIKVECAAPSAHARELCSVGH 859	2664
GGAGAGAGCTTCTGAGCCTAAGGCTGTGGGCTGGAGAGTGAACGCTTGGATGCTCTCTCTGAGC GELPAALKACEAGRVTBYGIAVL 1036	936	CCTGTCTCCAGCTGGAGCAGGCTCTCTCTGAGTGTGATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGAGC PVFQTGAKVTFLLLEPEFSCSLSLS 883	2736
GGTCACTCTCCGGGGCAGATGCTGCT RFLRRLVGLKLFIDPEQIQVGLVQY 1008	1008	CAGCTCTTGGAGCTGACTCTCAGCAGTGAAGCTGGAGAGAAATGCCCTTCAAGAAACAGCC QVFGKLYASSDSLRLHMGTLQSWTA 907	2808
GATGAGGATCTCTCTCAATGCTCAGAGATGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT DKRFFVTVTDEAALTDIVDALGDR 1080	1080	CAGCTCTGAGTACATGCAATGAGCCGACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT QTSAYIQYERHLLPSSBS3LHRYE 931	2880
ATTTTGGCTTGAAGGCTCCATGCGAAGCAAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT IFGLECHAHMSSSFGLENSQIGF 1152	1152	GTTCACTGATGGAGCCCT VHPYGTLPVGGPPEFXTTLRVOHL 955	2952
TGCTACTGCTGGAAGGATGGATTTCTTTGGATGCTGGGGCTATGACTGGGAGCTCTGTGTA STHALKDGI LFGMVCATDWWG3VL 1379	1379	GGCTGCTATGTGTGAGTGGCT GCYVVSGLIISALLPVAHAGWTF 979	3024
TGCTTANAGGAGCCAGCT WLEGGHRLFPFRHALEDEFPPALO 1053	1296	CTATGCT LSLSQVITMHA3CIVQHLTBPFGP 1003	3096
AACGATGACCTACTGGTACT RHAATLGLYSVSSMLLRGGRRLFLS 427	1368	CCTGTCT PVHPPEELQHTWRBLRGSWTOQVVR 1027	3168
GGGCTCTCTGATTTACATGGAGAAATCATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CAPRFRHRGKVIAPOLKKGAVRV 451	1440	TCCAGCTTGGAGGCTGGAAAGGAGCTGAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CHLGGDLAKGTEVSVGLLRLVHNEP 1051	3240
GCCAGAGCTCTGAGGGGAGGATGTTGTTACTTTGGAGTGGCTCTGCCCATTGGATACAGATAGG AOSLGGGEGQIGSTFGSELCPLQTD 475	1512	TCCGAGAGCCAGTCAAGTCCCTGAGGCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT FRAKFRSLTVVSTFLETGTEGSV 1075	3312
GATGAGCAATGATGTCTACT DCYTDVLLVAAPNPLGPFORRBTGR 499	1584	CTAGAGCTGATGAGCT LQLYEASRWSESLLEVYQTRPILI 1099	3384
GTTATGTTATGCTGAGCCAGCAGCT VYVTVLGGQDSLLTLOGGTLOPEPPO 523	1656	TCCCTGTGATCCTCATAGGAGTGTCTCTGGAGGTTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT SLWILIGSVLGGGLLLALLVFLW 1123	3456
GATGCTGGTTGGCTTGGCATGGAGCT DARFGFAHICALFDLNDCCFAADVAV 547	1728	AAGCTGCTCTTTTCCATAGCAAACTCCGAGGAGAAAAGAGAGAGATTTGGCAATGAATG KLGFFAHKKIPEERERLE 1145	3528
GGGCTCTCTGAAATGAGCCAGGGAGCTGTACTGTACTGAGAGCCAGCTGAGTGGATGAGCCCC GAPLEDGHOGALTYLXGTQ3GVVP 571	1800	TGATAGAGGCTTAGAATGCT GCTGAGTGGAGAGAGGCT AGGATGCTGCTGCTAGAGTAGGCT CACCT TATGCCAGGATGAATTTTTTCTGAGAAAAGAGAGGCGCAATTCATATCAAGCT 3884	3884

FIGURA 6

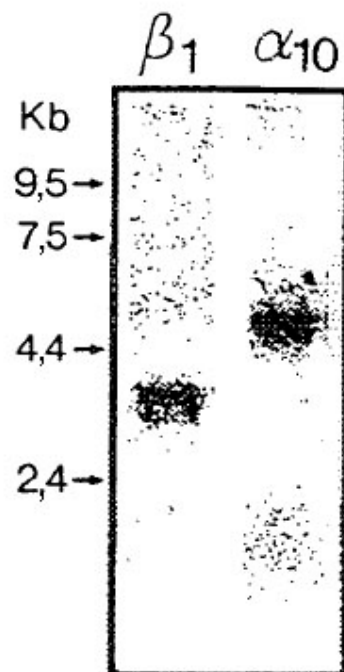
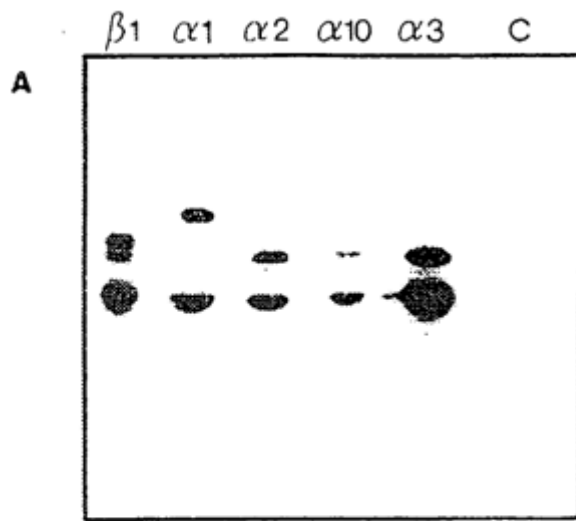


FIGURA 7



**B** IP:  $\alpha 10$   $\beta 1$   
Inmunotransferencia:  $\beta 1$   $\beta 1$

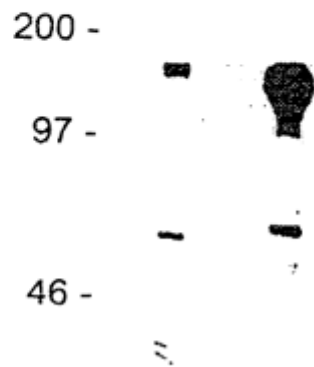


FIGURA 8

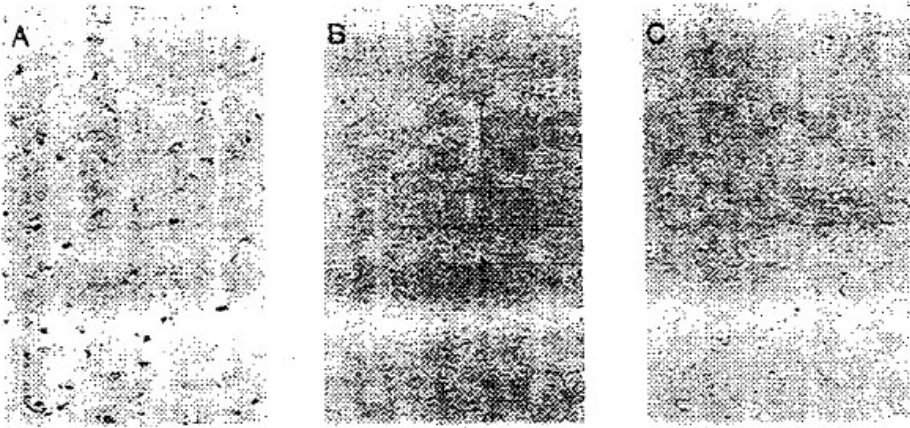


FIGURA 9

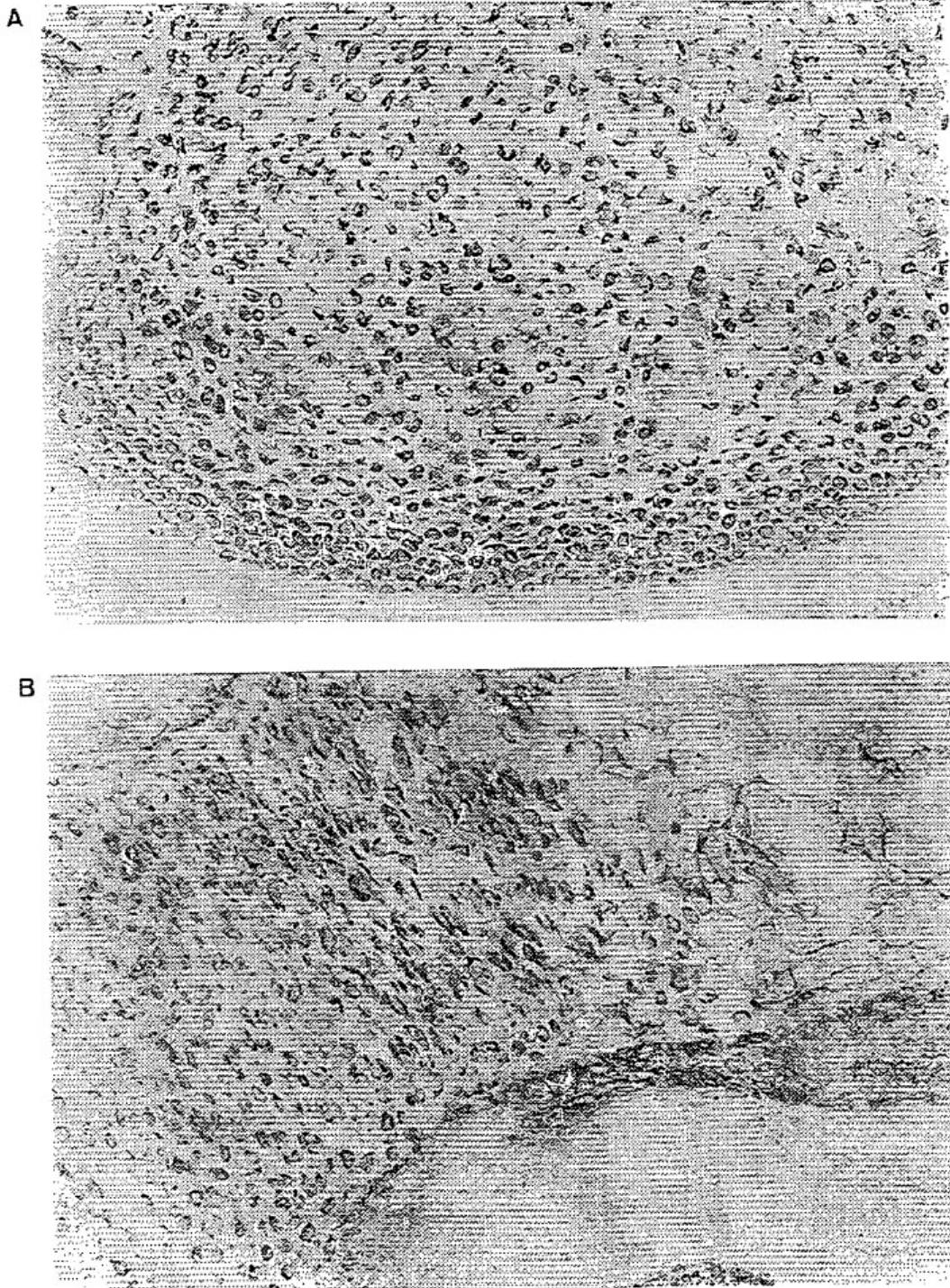


FIGURA 10

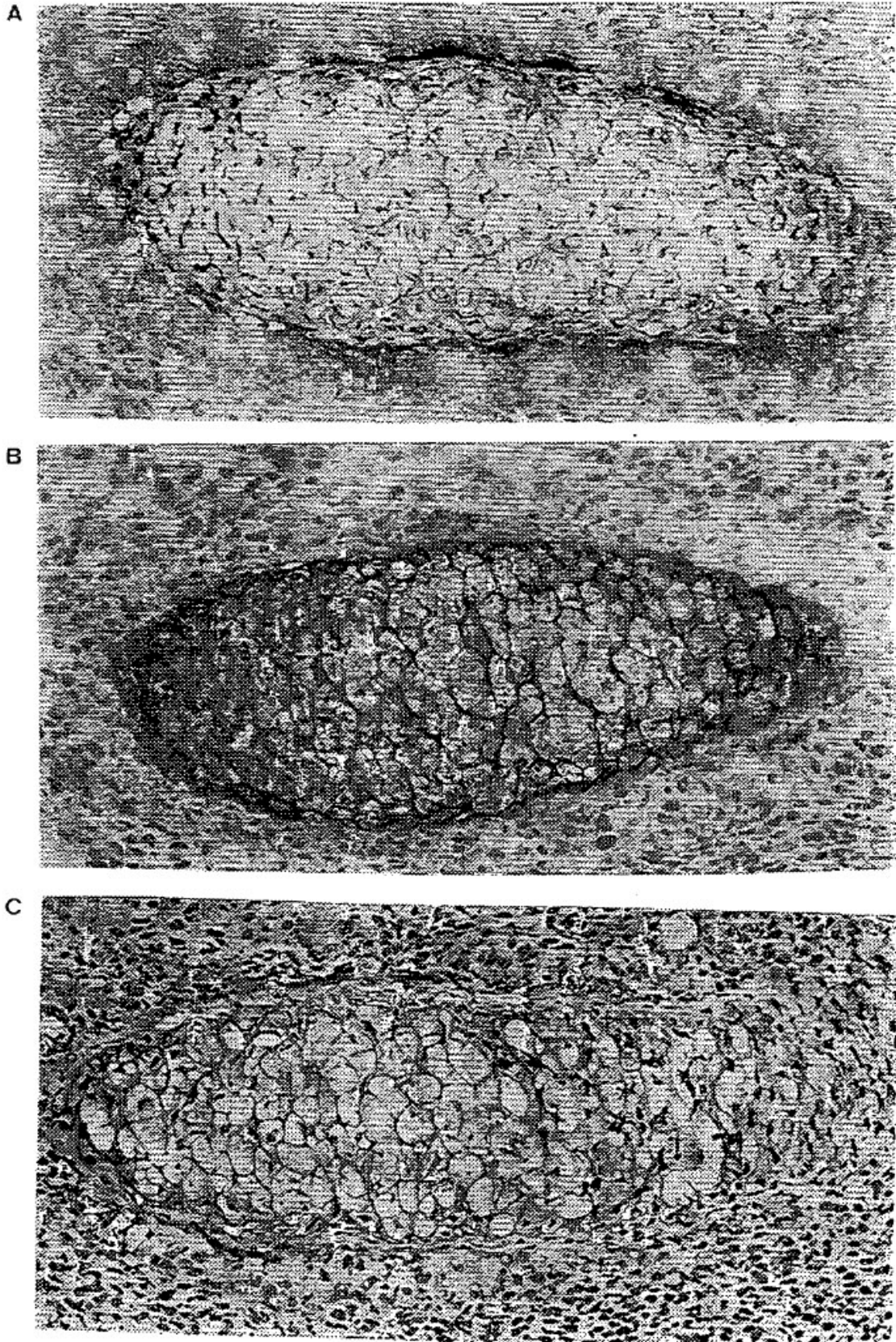


FIGURA 11

## Inmunotransferencia maestra de ARN humano

Tejido	expresión de $\alpha 10$	Tejido	expresión de $\alpha 10$
Aorta	++++	Glándula tiroidea	-
Tráquea	+	Glándula salival	-
Pulmón	++	Bazo	-
Pulmón fetal	++	Bazo fetal	-
Riñón	++	Timo	-
Riñón fetal	(+)	Timo fetal	-
Corazón	(+)	Leucocitos periféricos	-
Corazón fetal	++	Ganglio linfático	-
Médula espinal	++	Apéndice	-
Glándula mamaria	(+)	Placenta	-
Médula ósea	(+)	Cerebro completo	-
Intestino delgado	(+)	Cerebro fetal	-
Músculo esquelético	-	Amígdala	-
Hígado	-	Núcleo caudado	-
Hígado fetal	-	Cerebelo	-
Colon	-	Corteza cerebral	-
Vejiga	-	Lóbulo frontal	-
Útero	-	Hipocampo	-
Próstata	-	Bulbo raquídeo	-
Estómago	-	Lóbulo occipital	-
Testículos	-	Putamen	-
Ovario	-	Sustancia negra	-
Páncreas	-	Lóbulo temporal	-
Glándula pituitaria	-	Tálamo	-
Glándula suprarrenal	-	Núcleo subtalámico	-

FIGURA 12



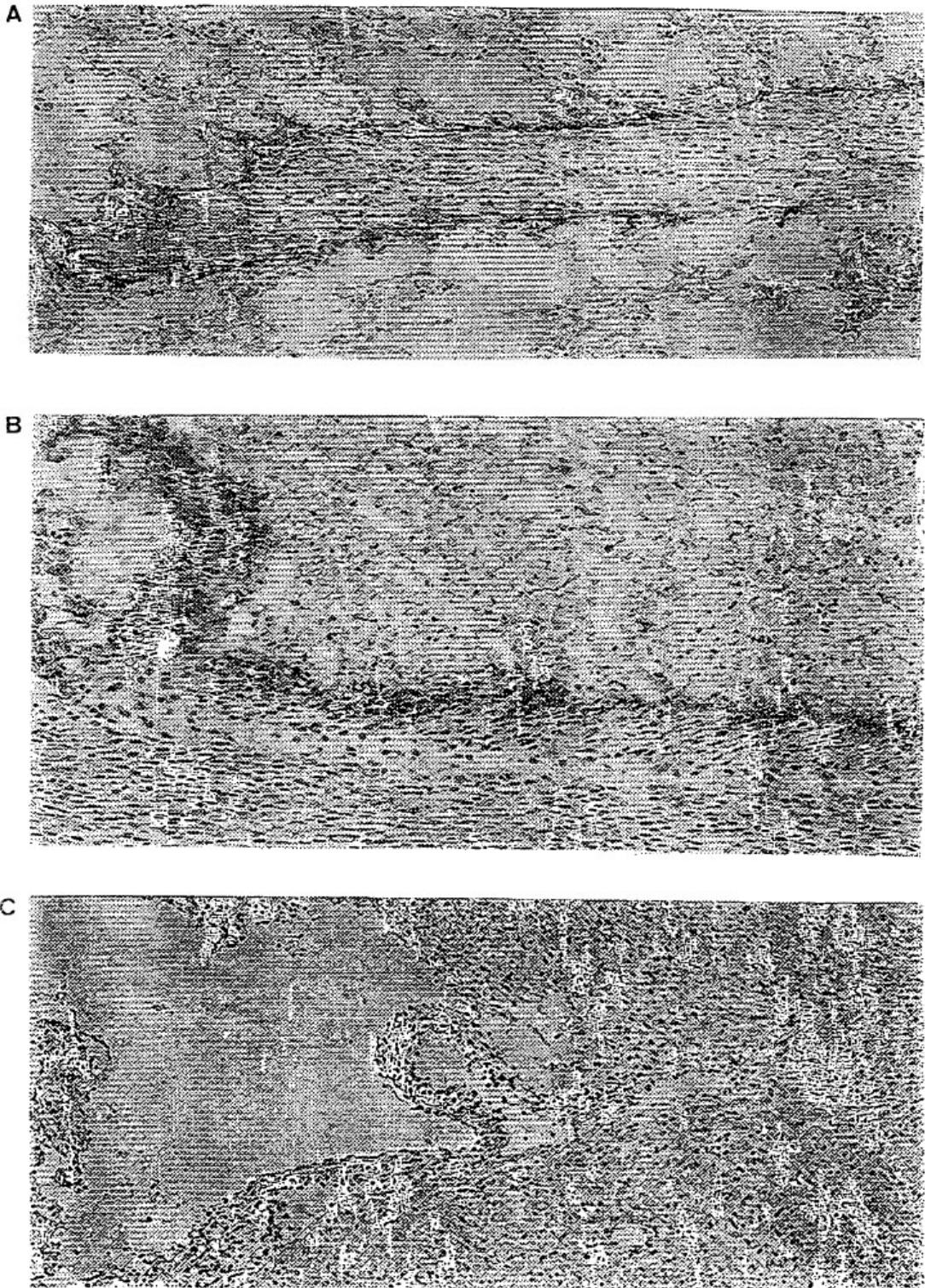


FIGURA 13



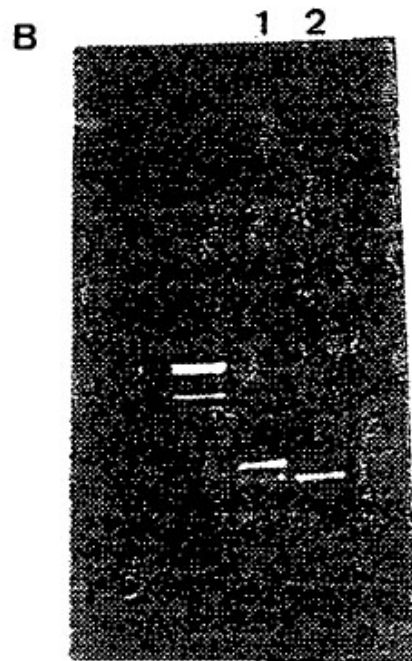
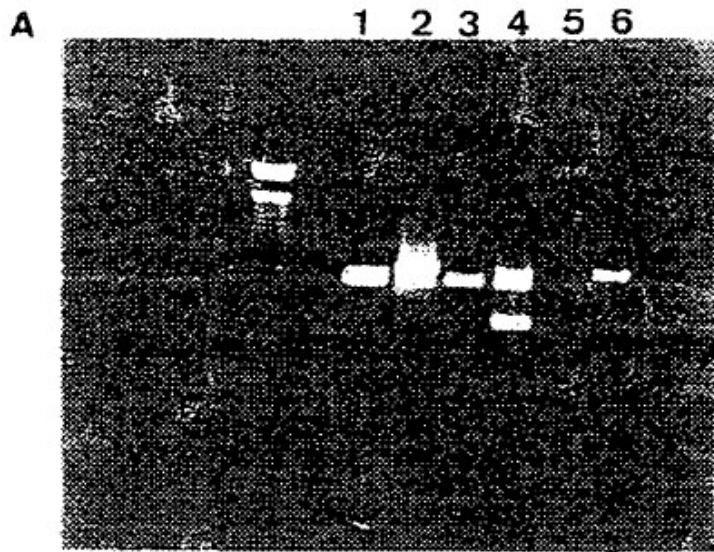


FIGURA 14

TGHTH0RKHCHCACCGAKHMSAKGNCCGAKGGTKKKGVAAVGTGACARAGCTNGHNAARANGAAGTATGACCGTGGGC 80  
 ? ? ? ? R ? ? ? P ? V ? ? ? D ? A ? ? K ? K Y D ? W A  
 ? ? ? ? H ? ? ? ? R ? ? ? ? V T ? L ? K ? ? S H T ? G  
 V ? ? ? ? G ? ? ? ? ? Q S ? ? K ? E V . P V G  
 CRAGATAGHKAMDAAGCNGHSAGKTRAMGGACGATGGHCCGCAAVCGABWGGNAHAHTBCGGCNMDCARNGTCCAAATK 160  
 ? I ? ? K ? ? ? ? G R W ? ? Q ? ? G ? ? G ? ? Q ? P H  
 P R . ? ? S ? ? ? ? D D G P A ? R ? ? ? ? A ? ? ? V Q ?  
 ? D ? ? ? A ? ? . R T M ? ? P ? ? ? ? ? R ? ? ? S K ?  
 SANKTCS CAGGAACCMACCGAMTGGCTCGCARCCCDTAGGGATCAGGKACGATGRCCTSCCGRNSKACTCSGNKTGATWA 240  
 ? ? ? R N ? R ? G S Q P ? G I R ? D ? S P ? ? S ? . ?  
 ? ? ? G T ? G ? A R ? P . G S G T M ? ? R ? T ? ? D ?  
 ? ? S Q E P T ? W L A ? ? R D Q ? R ? L ? ? ? L ? ? I  
 ATCGMNGTMCNGAGGGCGGGAATTRHAAAGTANTGGTHGAMAKATGNGVMGGAMATGATRRGTMGACTVTHVMGGVAK 320  
 I ? ? R ? A ? E L ? S ? G R ? M ? R ? . ? V D ? ? G ?  
 S ? ? V G R R R N ? K V ? V ? ? ? ? G ? D ? ? T ? ? ?  
 N R ? ? ? G G G I ? K ? W ? ? ? ? ? ? M ? ? R L ? R ?  
 VTAKSGGTACAGCGCAAKACARGRAKGTGTCTGAGGAADTCAGNAGGACAAMHTTGGCGAAGTCHGGACTTAGKATROAT 400  
 ? ? Y T R R ? Q ? ? ? V . G ? Q ? D ? ? A E V R T . ? ?  
 ? ? C T G E ? ? ? V S E E ? ? R T ? L P K S G L ? ? D  
 ? ? V Q A ? ? T ? ? C L R ? S ? G Q ? C R S ? D L ? ? I  
 ACGAANCKTROATCTTAMADGGGGGNKAGCGAGTCCSTAAACQVARATRGGNSWGTCTACTTMAACHCCAAGNGDGGACA 480  
 Y E ? ? I L ? G G ? R V ? K R ? ? ? ? L L ? ? O ? ? T  
 T ? ? ? S ? ? G ? S E C ? N ? ? ? ? V Y ? N ? K ? G H  
 R ? ? ? D L ? ? G ? A S A . T ? ? G ? S T ? T P ? ? D  
 TTTACTAGASGAGGAGAGTAGCCAGATCAGDGTGAGATGATCTAAKGTGGGGTCCCGTTGCCAGTATATGAGAGGACTGGT 560  
 F T R ? G E . P D H ? R . S ? V G S R C Q Y M R G L V  
 L L ? E E S S Q I T . D D L ? W G P V A S I . E D W  
 I Y . ? R R V A R S ? E M I . ? G V P L P V Y E R T G  
 TCGGACAGATWGATGCTCTTTGCTGACTCACATATTGTTGCCVTGAGKATGATCAGATACGATCTGWTGTCCTCATCA 640  
 R Q T ? M L F A D S H I V A ? ? M I R Y D L ? S L I  
 P G R H ? C S L L T H I L L P . ? . S D T I ? C P S S  
 S A D I D A L C . L T Y C C ? E ? D Q I R S ? V P S H  
 TGAATSTGRGCCGTGATGCTAATGAGATTCCCTATGATGGAACAAGAGACTTHTGCTACAGCAGGCAATGAAGGTTTC 720  
 M N ? ? R D A N E I R L . W N K R L ? L Q O A N E G F  
 . ? ? A V M L M R F A Y . D G T R D ? C Y S R R M K V S  
 E ? ? P . C . . D S P I M E Q E T ? A T A G E . R F  
 TAGAGTAGGAGTCTCAGGAGGAGAGAAACTGTGGACCTGGAGGACCAGGGACTCCAGGAGGAAGTGGCCACAACCTGGCTT 800  
 . S R S V S G R R R E T V R D L E D Q G L Q E E V A T T G L  
 R V G E S G G E R K L W T W R T W R D S R R R K ? P Q L L  
 L E . E S Q E E R N C G P G G P G T P G G S ? H N W L  
 GNAGTTTCGGCTCCGATCCTGATACWGGCTCGTCTTVGAGTATCCCCCTCTCTTGGCTGGATGGCTCAGAAATGCTCG 880  
 ? F R L R S . Y ? L V L ? V I P L S C W M A Q K C L  
 ? S P G S D P D T G S S ? E L S P S L A G W L R N A P  
 ? V G A F I L I ? A R P ? S Y P P L L L D G S E M P G  
 ACCTTTTCATCCCCACTGGACAAACTAGGCGTCTGGCGTGTGGCCCTGGGATTGTGGGGCTGTGTGGCCTCATATCCTC 960  
 D L F I P T G Q T R R L A L W P W D C G A V W P H I L  
 T F S S P L D K L G V W R C G P G I V G L C G L I S S  
 P F H P H W T N . A S G V V A L G L W G C V A S Y P  
 CATTCTGTCTATTCTCACCTAATCTGTCCCTGGHTACGACTCAAGCCYGACTGACAHTGTGGTACAAGATAAGGAGGG 1040  
 H S V Y S H P N L S L ? T T Q A ? T D ? V V Q D K E G  
 I L S I L T L I C P W ? R L K P ? L T ? W Y K I R R  
 P F C L F S P . S V P G Y D S S P D . ? C G T R . G G  
 AGCCAGGTGGGTGAGATGGAAGCTGAGATGGTNCACCTGTGCGMACCTCATTGTAATTCAACTNCCTTGACTGAAGTT 1120  
 A Q V G E M E A E M V H C V P T S L . F N ? L D . S  
 E P R W V R W K L R W ? T V C ? P H C N S T ? L T E V  
 S P G G . D G S . D G ? L C A ? L I V I Q L P . L K L  
 AAAATCCAGATCCYTAGGATGAGGGGAAGAACCTGCCAAGACGGGTGAGGAGCCAGTCTAAGGGAAGGCTCCTGCA 1200  
 . N P D P . G . G E E P A K D G S G R O C . G K A P A  
 K I Q I ? R D E G K N L P K T G O E G S A K G R L L Q  
 K S R S L G M R G R T C Q R R V R K A V L R E G S C  
 GGCCTGTCAGTGGACTTCATTGAGTCCCATGCGAGAATCTCATAGCTCTTCCCYTATCTCTGCTCTGAGTCTAG 1280  
 G L C S W T S F S P I A R I S . L F P L S L C L E S S  
 A S A V G L H S V P L P E S H S S S ? Y L S V L S L  
 R P L Q L D F I Q S H C Q N L I A L P ? I S L S . V .  
 TTAAGAATTTGTTACCGGAGACAGAATTTCTTTCTTAGCCCTCCTGOCAGATATTTAAAAGGAGGGGGTGGGTACTT 1360  
 . E F V T G D R I L F L S L L A R Y L K G G G W V T  
 V K N L L P E T E F S F L A S W P D I . K E G G G L L  
 L R I C Y R R Q N S L S . P P G Q I F K R R C V G Y F

FIGURA 15a

TTTGGTAGGGGAAGCTTAAGTTATGGATAGCAAAGTGCTAATGTAT\*CTTTTTTCTGAAACCTCATGTAGCATTITTC 1440  
 F W . G K L K L M I A K C . L Y S F F L K P H V A P F  
 F G R G S L S Y G . Q S A N C I L P F . N L M . H P S  
 L V G E A . V M D S K V L I V F F F S E T S C S I F

TTCCCTCCACCTCCATACTTTCCAGGCTTCAATTCATGCCCGGGCTCTCTCGCTCACACCGCTGCAGGCTGTTTGA 1520  
 F P S T L H T F P G F I S C P A S L R S H R C R L F E  
 S L P P S I L S Q A S F H A R R L F A H T A A G C L  
 L P F H P P Y F P R L H F M P G V S S L T P L Q A V .

GGCTTCCCTCCGCTGCTGCTCAGCAGACTGCCCTCCACACTTCCAGTTTCTGCGTACACCTTGATATTAGAGTTTCT 1600  
 A S P L G L P Q O T A S T L S S F C V H V D I R V S  
 R L L P W V C L S R L P P H F P V S A Y T L I L E F P  
 G F S P G S A S A D C L H T F Q F L R T R . Y . S F L

TCCCCTTGGCTCTTCTCTGACTACCCAGGCTGATGCCATGTCTGGCTCTTCTCTGTAATACTGTACAATG 1680  
 F P T W L L L F L . L P R L M F C L A S S C K Y C T M  
 S P L G S C S F S Y P G . C H V W P L P V N T V Q L  
 P H L A L A L S L T T Q A D A M S G L F L . I L Y N

ATTCTATGTAATAACTGGTCTTCCACAGAGCAAGCAAGCCTTCTAGGCTAACAAATTAAGATCAAGTTTGTCTCAC 1760  
 I L C K . L V L A H R A S K P S R L T N . R S S L L T  
 R L L P W V C L S R L P P H F P V S A Y T L I L E F P  
 D S M . I T G F C P Q S K Q A F . A N K L K I K F A H

TCATTTTTTATTCAATTCAAGATGGCGGGGGTGGGGTGGGGGGGGATGGCTGTTTTCACTGTGGTACCTAGGCAG 1840  
 D F F I O F K M A G G G V G G R I A C E H C G T . A  
 L T F L R F W R G V G W G G G A D C L F S L W Y L G R  
 . L F Y S T Q D G G W G G G A D C L F S L W Y L G R

GGCTGAAGCTCTGAGCTCCCTGCTTTAGGCTTCTGAGTAGCCTACAGTGAGTGTACTGTGTCCAGCTGCTCGTTGACA 1920  
 G L K L . A P L L . A S E . P T V S V T V S S C S L T  
 Q . S S E L P C F R L L S S L Q . V L L C P A A R . H  
 A E A I S S P A L G P . V A Y S E C Y C V Q L L V D

TCTGGTCTCTAGGCTGGTCAATGTAAAGCCTTAGCTCTGACTGTGGATGGCTTTCTTGGGTTAGCAGTAACAT 2000  
 S G L S W S G H C K P . L S D C G W L S L A L A A N M  
 L V S H G L V I V S L S L T V D G F P W R . Q L T  
 I W S L H V W S L . A L A L . L W M A F L G V S S . H

GGTTACAGGATTTCACTGAAATTTAAATGTTGGGGGAAAGGTGGGGACACACCATATGGTCCCAATTCAAAACAATCC 2080  
 V T G F H . K F K C W G K G A D T P . W S Q P K T I  
 W L Q D P T E N L N V G G K V R T H H N G P N S K O S  
 G Y R I S L K I . M L G E R C G H T I H V P I Q N N P

GTGAAACAGCCTCAAGTTAGGGGTGAGATGTTTTCAACCAAAGTAATTATCTTGACACCACAAAGCACACCTGTCTACAG 2160  
 R E T A S S . G . D V F N O S N Y L D T T K H T C L Q  
 V K Q P Q V R G E M S T K V I I L T P Q S T P V Y R  
 . N S L K L G V R C F O P K . L S . H H K A H L S T

GCAGTACTCCCCAAAGCTATTAGACACACAACAAGCATGACCATAACTCAGTGGATTGGCAAGGTACACAGTAGGAC 2240  
 A V T P Q K L L D T Q Q A . P . L S G L A R S H S F T  
 Q . L P K S Y . T H N K S M T I T Q W I G K V T Q . D  
 G S D S P K A I R H T T S M T I T Q W I G K V T Q . D

TGCCCTCACACAGTAGGTAGGAAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2320  
 A L H T V G R K H L L S L L S A V I L H I P C . D .  
 L F P T Q . V G K C C C H C C Q L L F C I S H V K I N  
 C P S H S R . E N A A V T A V S C Y F A Y P H L R L I

AAGGCAAAAATATTGCTCTAAGTCTACTTTCTGTTCCAACTGGAGGAAAATATTGAATAAATAAACCGTCATAAA 2400  
 . G K K Y C L . V L L S V P N W R K L L N K . T V H K  
 K A K H I V S K S Y F L F Q T G G N Y . I N K P C I K  
 R Q K I L S L S P T F C S K L E E I I E . I N R A .

AGTAGCCTCAGAAAGGTCAAAATTTGCTTTTCTTTGAATATTAGCTGAGGCTCCAGGGGGCAGCACCAAGGTAGACA 2480  
 S S L R K G Q N L C F L . I L A E A S R G Q H Q G R E  
 V A S E R V K I C V F F E Y . L R P P G G S T K V E  
 K . P Q K G S K F V F S L H I S . G L O G A A F R . R

GCTGSACTAAGGCT 2560  
 L D . G C S V F L S W A P H S S L P P P L F F H P T  
 C W T K A A L C S C P G L P T A P F H H S H S I Q L  
 A G L R L L C V F V L G S P Q L F S T T T P I P S N F

TATTTTTAGCTCCAGTGGGAGGGGGCAGGATAGGAGGAAAGTAAAGAAAAGCAGCAAGGAGAGGGACAGAGCAACTCA 2640  
 L F L A A S G R G Q D R R E S N E N S Q G E G Q S N S  
 Y F . L P V G G G R I G G K V T K T A K E R D R A T Q  
 I F S C Q W E G A G . E G K . R K Q P R R G T E O L

GAGCCTCTCGAGCTGGACCGACAAAGCCCTGAGTCTCTCTCCATCCCTGACCTGCTCCTGCCCCGGGGTGGCTGA 2720  
 E P L G L D R T S A H G V S L H P S P A P A P A P G V A D  
 S L S D W T G Q A P M E S L S I P H L L L P L A T L  
 R A S R T C P D K R P W S L S F S L T C S C P W R ? .

FIGURA 15b

CAGGTGAGGGGAAGCAAACCTTGGTTCTGCTGGGAATGGAAGTTATGTGGATTGTTTATAAATGGGACCATTATGGCTAAA 2800  
R . G K Q T W F L L G M E V M W I V Y N W D H Y G .  
G E G S K L G F C W E W K L C G L F I I G T I M A K  
Q V R E A N L V S A G N G S Y V D C L . L G P L W L K  
ATCTYGCGGGCGCTCAGGTGGGAGTTAATACCGATGCTATATTTCTGTGTGCACTCATGTTCTTAGACACCCAAATGG 2880  
N L A G A Q V G G . Y R C Y I S C V H S C S . T P K W  
I ? R A L R S E V N T D A I F P V C T H V L R H P N G  
S ? G R S G R R L I P H L Y F L C A L M F L D T Q M  
CAGTGGCCAAAACCTTCTCTGGCTTGTACCTCATTATCTAAACCTTTGTACCTAATTATCTAAAACCTTGGTCCCTAAACT 2960  
Q W P K L P L A C T S L S K P L Y L I I . N L G P K L  
S G Q N F L W L V P H Y L N L C T T . L S K T L V L N  
A V A K T S S G L Y L I I . T F V P N Y L K P W S . T  
CCACAGACATGAGGGCACAGAAAAGAGAGCTGTCTCTCATCTCCATTCCGTTACACTGATTCCCTACCTTCCCTGCTTCT 3040  
H R H E G T E K R R V S H L P F G Y T D S Y L P C F  
S T D M R A Q K R D V S L I F H S V T L I P T F P A S  
F Q T . G H R K E T C L S S S I R L H . F L P S L L L  
CCCTGCCATTGGTGCTCCTTGGTGCTGAGGCATAATGCTTACTATGTGGTCAGAACTCTGGGTTCCGCTAACGACCG 3120  
S L P L V L L G A . G I I A L L C G Q N S G F A . R P  
S C H W C S L V P S A . L P Y Y V V R T L G S P N R  
P A I G A P W C L R H N C L T M W S E L W V R L T T  
AGCTACAGTTTCTGGTCTCATAGCCCTGCCAATTTCTGGATTAAAAAAGGCTCACATATAAAATACCTTTTCTGA 3200  
S Y S F W S H S P A N F L D . K K K A H I . N T F S E  
A T V S G L I A L P I S R H R W D P K R G L K F E E  
E L O F L V S . P C Q F P G L K K K G S H I K Y L F .  
AAATGAGCAGTGTGAGTTGAAGTTAGATTTGGGGGATGGAGGGTCTTGGATGCAAAGAGCAAGACAGTAGAGAAG 3280  
N E H S V S . S . I L G D G G L L G C K E Q D S R E  
K M S T V . V E V R F W G M E G C L D A K S K T V E K  
K . A Q C E I . K L D F G G W R V A W M Q R A R Q . R R  
AGAATCATGGGAGGGATAAGAGGCTGGAATTTTCTGCTAGTGCCTATAATCTTTGTTTCTAAAATAACAGCTCTG 3360  
E N H G R D K R L E F F P A S A L . S L F P K I T A L  
R I M G G I R G W N F S L L V P Y N L C F L K . Q L .  
E S W E G . E A G I F P C . C P I I F V S . N N S S  
ATTTTATGGGAATGGGGTCAGGAGAAAGGAATCAGTAGGCACAGATGGGACCCCAAGCGTGGACTAAAAGTTTGAGGAAA 3440  
I L W E L G S G E P N O . A Q M G P Q A W T K V . G N  
D F Y G N W G Q E K G I S R H R W D P K R G L K F E E  
D F M G I G V R R K E S V G T D G T P S V D . S L R K  
CTATGGGAGTAGGCAAGGGTGTGTAAAGGTGATGAGATGAGGAGATGTGGTGGGGGGAGTCTTGGGGGTGATAGG 3520  
Y G S R Q G V F V R W M R . G D C G G G G E S W G .  
T H G V G K G L . G G . D E E I V V G G S L G G D R  
L W E . A R G V C K V D E M R R L W W G G V L G V I C  
ACCCTTAACAGGGATAGATGGCAAACCTGTGTGTGGGACGGCCGCTGCTCCACCCACTTAATTAGCGTTGAGGTTGGCAG 3600  
D P . Q G . M A N C V W A G R W F H P L N . R . G W G  
T L N R D R W Q T V C G A G G S T H L I S V E V Q  
P L T G I D G K L C V G A P V V P P T . L A L R L A  
GGCTGGAAGGAGCCAGCACTCTCAACCTTGGGAAAGTGCAAGTGTGACAAGAAGAAACAGAAAGAGGAGACCCCGGGC 3680  
G W K E P A L S T L E K V Q V . Q E E T E R G D T R A  
A G R S Q H S O P W R K C K C D K K K Q K E T P G  
G L E G A S T L N L G E S A S V T R R N R K R R H P G  
AGGGAGCTCCTTGCCATCGTTTCTTCCCATGCGCCCTGGCTTTGGGAAGAATTAGGAAAGGGTGGTGACTCTGCATCCTCA 3760  
G S S L P S F L P M A L A L G R I R K G W . L C I L  
Q G A P C H R F F P W P W L W E E L G K G G D S A S S  
R E L L A I V S S H G P G F G K N . S R V V T L H P Q  
GAAAAGCCCTCTCCTCTTGGACTCTCGAGGCTTAGAGAGGAGAATGTGTAGGAGGAATGATGTGGAAAGAGTAACT 3840  
R K A L S P S L D S R G L S R R M C R R N D V E R V T  
E K P S L P L W T L E A . R G E C V G G M M W K E . L  
K S P L S L F G L S R L R E E N V . E E . C G K S N  
TGACCTATCCAGATCTGTCTGTAATGAGATTTACGGAATGAGAATGGAATACAGCTGTGCTTACCATGGCCGAGGGC 3920  
. P I Q M C L . M R F Q E . E W K Y S C A S A W P R A  
D L S R C V C E . D F R N E N G N T A V L Q H G R G  
L T Y P D V S V N E I S G H R M B I Q L C F S M A E G  
CTTAGGATCCCTCACCCCAACCCACAGGAAGAGAATCATCCAATCATCCACCTGGGGTTCTGAGGACATGACATTGAC 4000  
L G S L T P T P Q E E N H P I I P P G V L R T . H .  
P . D P S P P P H R K R I I Q S S H L G F . G H D I D  
L R I P H P T T G R E S S N H P T W G S E D M T L T  
ACAGAGCAGGAGAGCTGAGATAGAAACACTCCCTCCTGTCTTGTCTCCCACTAAGCCCTCAACAGTCTTCACTAACTGAT 4080  
H R A G E L R . K H S L S C L P L S L T S P S L T D  
T E O E S . D R N T P S C L V S H . A S P V L H . L I  
Q S P R A E I E T L P P V L S P T K P H O S F I N .

FIGURA 15c

TGOTGGATGCTAATTATGATCCTCACCCCTCAGGTCTCTGCTCCCCCTTTAATCTGGATGAACACCACCCACDAGCTTTC 4160  
W W H L I M I L T P Q V S A P P L I W M N T T H D S S  
L V D A N Y D P H P S G L C S P P N L D E H H P R L F

ACAGGGCCACCAGAGGCCGAATTTGGATACAGTGTCTTACAGCATGTTGGGGGTGGACAGCGATGGTGAGAGGGGAAAACA 4240  
Q G H Q R P N L D T V S Y S M L G V D S D G E R E N  
H R A T R G R I W I Q C L T A C W G W T A M V R G K T  
T G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q R W . E G K Q

GAGGACCGTGGGATCGGACTATGCACTCACTGATAAAGGGGAGGACCGGTCCAAGCTGGCCTTTGAAAGTGCCTGGGGC 4320  
R G P W D R D Y A L T D K G E D R S K L A F E S A W G  
E D R G I G T M H S L I K G R T G P S W P L K V P G A  
R T V G S G L C T H . . R G G G P V Q A G L . K C L G

TCCATGACGTCTCATGCACTCTCCCTCTCACTATACTAAGGACCATGCTCACCGGATCTTTATATCCATATTCTCCTTCC 4400  
S M T S H A L S L S L Y . G P C S P D L Y I H I L L P  
L H D V S C T L P L T I L R T M L T G S L Y P Y S P S

AGGATGCTGTGGTGGCCCTGGGATGGGCCATCAGGTGACCGGAGAGGGGATGTTTATCGTGTCTATAGGGGGATT 4480  
G C W W V P P G M G H Q V T G E R G M F I V A L . G D  
Q D A G G C P L G W A I R . P E R G C L S L L Y R G I  
R M L V G A P W D G P S G D R R G D V V R C S I G G F

CCACAGTCTCCATGTACCAAAAGGCCACCTGGGTAAGAAGAAGCCCTGACCTTTCCCTGCTAATTCCTGATGTTGACATC 4560  
S T V L H V P K A T W V R R S I T F P L L I P O V D I  
P Q S M Y T Q R P P G . E E A . P F F P C . F L M L T S  
H S A P G T K G H L G K K P D L S P A H S . C . H

TAGTAACCTGACCCCTTGGACCTTGTCTTCAATGACCCCTGAAGTAAAGAAGCCGAAGTATGACCCCATGACTTCATTCT 4640  
. . L . P L G P C L Q . P . T K E A E L . P H D F I L  
S N S D P L D L V F N D P E L K K P N Y D P M T S F  
L V T L T P W T L S S M T L N . R S R T M T P . L H S

CTTCTACCCCTTCTCCAACCAAGGTGACTATCAACTTGGAAATTCCTCTCAGCCTGCTGTGAATATGCACCTAGGGATGTC 4720  
F Y P S S N Q V T I N L E I P L S L L . I C T . G C  
S S T L P P T R . L S T W K P L S A C C E Y A P R D V  
L L F F L Q F G D Y Q L Q N S S Q P A V N M H L G M S

TCTACTAGAGACAGATGCTGATGUGGGATTCTGTTGAGCTGAAAGAAGGGCCTCAGAAGGTTACACAGCAGGGAAGAGAG 4800  
L Y . R Q M L M G D S W . A E R R A S E G S Q Q G R E  
S T R D R C . W G I H G E L K E G P Q K V H S R E E S  
L L E T D A D G G E M V S . K K G L R R F T A G K R

CATTATGGTATCTGGGAGTGGTGGCTTGGCCCTTTCCATCCAGTGTCTGGAGGCAGAGTCAAGCCCTGATCTACAGAGT 4880  
H Y G I W A V V A W A P H P S V L E A E S G L I Y R V  
I M V S G O W L G P P I P V F W R Q S O A . S T E  
A L W Y L G S G G L G L S S Q C S G G R V R P D L Q S

GAGCTCCAGGACAGCCAGGCTATGCAGAGAAACCCCTGTTTGA AAAACCCAAAACCAAACTAAGCAAAACAACAAC 4960  
. S S R T A K A M Q R N P V L K N P K P K L T K Q Q Q  
. A P L P R L C R E T L F . K T Q N Q N . P N N N N  
E L Q D S Q G Y A E K P C F E K P K T K T N Q T T T T

AGAAAAGCACCGTGGTAAAGGAAATTAAGTCTGTATAGAAGAGACAAAGAAATCAAAAACCCCTAGAGAGCAAGGCAGGGTT 5040  
Q K K H R G K G N . S V . K R Q G I Q N P R E O G R V  
R K S T V V R E I S L Y R R D K E F K T L E S K A G F  
E E A P W . G K L V C I E E T R N S K P . R A R Q G

CCCCATGGAGTGGTCTCCTCTCTCTTTAACTAGGTGTGTGTTCCGAGAGGCCCTCTCAAGCCCTGGGATAACTATTTC 5120  
P H G V V S I S L L T R C V F R E A L S S L G I T I S  
S P M E W S P S L F . L G V C S E R P S Q A W G . L F  
S P W S G L H L S F N . V C V P R G P L K P G D N Y F

TCCTATCCACCAGGCCCTGTGCCCTCTTTGGTCTCGTGCCTGCGGCAGCTCTGTCTCAGTCTGGAATATGTGCCCGT 5200  
P I H P G L C P S L V S C L R Q L C L Q F W N M C P  
L L S T Q A C A P L W S R A C G S S V F S S G I C A R  
S Y P P R P V P L F G L V P A A A L S S V L E Y V P V

GTGGATGCTTCAATCCGGCCCCAGGGAAGCCTGGCACCCACCGCCCAAGTGAAGCCAGTGGGAAGGGCCCTGGAAGCTCAG 5280  
C G C F I P A P G K P G T H R P T . A S G R A L E A Q  
V D A S F R P Q G S L A P T A Q R E P V E G P W K L S  
W N L H S G P R E A W H P P P N V S Q W K G P G S S

TTCCAGATAGGGATGCTGGGTGGGAAAACCTAGGACAAAGACTTGGTGGAGGGTCTGCATGGCTATCCTCATCATTCCC 5360  
F P D R D A G W E K L G Q R L G G G S A W L S S S F P  
S Q I G H L G G K N . D K D L V E G L H G Y P H S S  
V F R . G C W V G K T R T K T W W R V C H A I L I P

AAGTGTGCTTGCAGAAGAGGCTCCTGTTTGGTAACTGATTAGAATTGAGACTCCTTAGGAGAGCCCAAGACACCAGGAT 5440  
S V L A E E A P V C . L I R I Q T P . E S L K T P G  
Q V C L O K R L L P A N . L E F R L L R R A S R H Q D  
K C A C R R G S C L L T D . N S D S L G E P Q D T R I

FIGURA 15d

CTGGTTTTACCAACTTAAAAACAAAACAAAACAGCATATCCTGTGCAGGCCTATCCCTCATCCATCAGGTGTCCTCCAT 5520  
S G F T H L K T K Q N S I S C A Q P I P H P S R V L H  
L V L P T . K Q N K T A Y P V H S L S L I H H V S S I  
W P Y Q L K N K T K Q H I L C T A Y P S S I T C P P

ATCTTATTTTTTGGGTCTTATAGATGCCAAGTCAGCACTCAGTTATTGGGTTCTCCCTCATGCCCTTTCATATACTTTC 5600  
I L F I W V L . N P S Q H S V I G F S P H A P H I L S  
S Y R C G S Y R C Q V S T Q L L G S P L M P P I Y F  
Y L I F V G L I D A K S A L S Y W V L P S C L S Y T F

TTATCTACTGCCCTTTGGGAGATAGTCTTATGTAGCCAGGCTGTCTTGTATCTTGGAAATTTGCTTGCCTCAGCTTCTCA 5680  
Y L L P F P R . S Y V A Q A V L D L G I C L P Q L L  
L I Y C L L G D S L H . P R L S L I L E F A C L S F S  
L S T A F W E I V L C S P G C P . S W N L L A S A S Q

GTCTCAAAGTACTGGGATAAATAGGCATGCATTGTCTGCCTGGCCTTGTCTGAACATGCCCTCTGTGGCCATTGGTAGGGCA 5760  
S L K Y W D N R H A L S A M P L L N M P S V A I G R A  
V S S T G I T G M H C L P G L C . T C P L W P L P L G H  
S Q V L G . . A C I V C L A F A S H A L C G H W . G

TGATCAAATACTGCCCTCCCCACACACACACAAGTGAAGTGAAGGCTCTCTAAGTGTCCATAGCACAGGGTAGT 5840  
. V K Y C P P Q H T H K R K . G S L S V P . H R V V  
E S N Y A L P P Q H T H T N E S E A L . V F H S T G .  
M S Q I L P S P T T H T T K V R L S K C S I A Q G S

GGTAGGCCCTCTGGTAGTCATATTTTCTTACTCTGCCATCTCTCTTTCTTGTATTTCCACACTGGGGACCTG 5920  
V G L S L V H I S F F Y S A H L F F L . F P H W G F  
W . A S R . C I F H S F T L P I S S F F D F H T G D L  
G R P L A S A Y F I L L L C P S L L S L I S T L G T W

GCATAGTACTTTCTCGTAATTAAGAGAGAATCCCTTTAAGTGCCTGCATTGCAGCGTCCCTCTGGGACATTCTCCCT 6000  
G I V L S W . L R E N S L L S A C I A A S S W D I L P  
A . Y F P G N . E R I P P . V P A L Q R P P G T F S  
H S T F L V I K R E R I P F K C L H C S V L L G H S P

TGCTGACTACACCCACATCCTTCCATGTTTTTGTGTTCCCATCACTATGCCCCCTTCTAGGCTGTCCACATACATGG 6080  
G . L H P T S F H V F C F P S L C P P S R L S H I H G  
A D Y T P H I P S M F F V S H I Y A P L L G C P T Y M  
L L T T P H I L P C F L F P H I T M P P F . A V P H T W

ATGTCGTCAATGTTTTGGATGGCTCCAACAGTATCTATCCCTGGTCAGAAGTTCAGACTTTCCTTCGGAGGCTGGTAGGA 6160  
C R H C F G W L Q Q Y L S L V R S S D F P S E A G R  
D V V L V L W D G S N S I Y P W S E V O T F L R R L V G  
M S S L F W H A P T Y S I P G Q K F R L S F G G W . E

AGACTGTTTCATCGATCCGGAGCAGATACAGGTAAGAGAAAGATATGCGATAGGATTOGAGGGAAAGAAGTAAACACTCC 6240  
K T V H R S G A D T G K R K I C G . D W R E R S K H S  
R L F I D P E Q I O V R E R Y V D R I G G K E V N T P  
D C S S I R Y R . E K D M W I G L E G K K . T L

TGGACCTTGGATGTAAGCAGCCATGTCCAGCCTCTGTATGACACCCCTGGGACATTGTCTTCTACAGAACTCATGCTCAA 6320  
W T L G C K Q P C P A S . . H P G T L S S T E L M L K  
G P L D V S S H V Q P L D D T L G H C L L Q N S C S  
L D P W M . A A M S L L M T P W D I V F Y R T H A Q

GAACTGTGCAATTAACCTACCAAAAAGTCAAAAAATTTATAATGTTGAAGTAAGTTTATGATTTGTGGGGGGCCAC 6400  
N C A I N L P K S H K N F I M F E V S L . L C G G P  
R T V Q L T Y Q K V T K I S . C L K . V Y D C V G G H  
E L C N . L T K K S Q K F H N V . S K F M I V W G A T

ACTCAGAGCTTCCCTTTGCTGCTGTAGTTGCTTGGGCAATGCATGCCATGAGGCTGCAAGTTAGACACACCTGTTCACTT 6480  
H S E L P F A A C S C L G N A C H E L Q V R H T C S L  
T Q S F P L L L V A W A M H A M S C K L D T P V H F  
L R A S L C C L . L L G Q C M P . A A S . T H L F T

CCCTTTCATCGTGCAGGTGGGACACCTGTTAGGGGTTCACTTCCCTTTCATCCTTTGTGCTCCATCTTCTCTACG 6560  
P L H R A A G W T H L L G V H F P P F I L C A P S S L R  
P F I V L Q V G H T C . G F T S P S S F V L H L L Y  
S P S S C C R L D T P V R G S L P L H F L C S I F S T

CTCTTACATACATCCCATGTGGGCACATGCTATTGTTCTCAGGTAGGACTGGTACAGTACGGGGAGAACCCTGTGCATG 6640  
S S Y I P C G H M V Y C S Q V G L V O Y G E N P V H  
A L H T S H V G T W S I V L R . D W Y S T G R T L C M  
L F I H F M W A H G L L F S G R T G T V R G E P C A .

AGTGGTCCCTGGGAGACTTCCGAACAAAGGAAGAAGTTGTGAGAGCAGCAAGGAACCTAAGTCCGAGGGAAGGGCGAGAA 6720  
E W S L G D F R T K E E V V R A A R N L S R R E G R E  
S G P W E T S E Q R K K L . E Q Q G T . V G G K G S K  
V V P G R L P N K G R S C E S S K E P K S E G R A R

ACGAGAACCAGGATCATGGTGGCATGGTGGAGACATTGTAAAGGGTCTGTGAGGGAGGAGGAAGGATCAGCAG 6800  
T P T A Q A I H V A W . D I V K G S C E G G G R I S R  
R E P P P K R S W W H G E T L . R G R V R E E E E G S A  
N E N R P S D H G G M V R H C K G V V . G R R K D Q Q

FIGURA 15e



GGAGAGGGAGAGGGTCTGGAGTGTAGTGTATACATCACAAAGATGCTCTGGGGCTTATCTTTATCTGCATGCCAGAAGTT 6880  
 E R E R V W S V V Y T S Q D A L G A Y L Y L H A R S  
 G R G R G S G V . C I H H K M L W A L I F I C H P E V  
 G E G E G L E C S V Y I T R C S G R L S L S A C Q K F

CGTGGAGGAAGGCTAGGTTGCTGTCCACTACTCTCTTACTGTATTGTCATTTTATGGTGTCTGTGGGTGTATCTCTC 6960  
 S W R K A R L L S P Y S L L L Y L H F M V S V G V S L  
 R G G R L G C C H H T L S Y C I C I L W C L W V Y L S  
 V E E G . V A V T I L S L T V F A F Y G V C G C I S

CTTGTCTGTTCTGTTTCTGCACACAGAAGTCCATCTTTCTCTTACTCTGGGTCAATTCTGATACCTAGCTTCTCAA 7040  
 L V C S V S A H R T P S F L F Y S C V N S D T . L L N  
 L S V L F L H T E L H L S S S T P A S I L I P S F S  
 P C L F C F C T Q N S I F P L L L L R Q F . Y L A S Q

CCACTCAGCCCTAGTATTCTTTCAAACATGACTCTAAACCTCTGGGGAGGCTACATGACCTGACTGTCTTTATTCTCC 7120  
 H S R P S I L F K H D S K P L G R L H D L T V F I L  
 T T H A L V F F S N M T L N L W G G Y M T . L S L F S  
 P L T P . Y S F Q T . L . T S G E A T . P D C L Y S P

AGTTCCTTGATCTTGTCAACCCCAAGTGTGCTGAATGAATCTATAAAATAAATAATGCTGTACATATTTACACTGATGA 7200  
 Q F L D L V N P S V C . M N L . I N N A C T Y L H . .  
 S S L I L S T Q V F A E . I Y K . I M L V H I Y T D D  
 V P . S C Q P K C L L N E S I N K . C L Y I F T L M

CAGATTATTTATATGTTCCGTGCCATCTAAACAGTCAAGTGTGACTCTGTGCCAGTTTGCATGCTAGATACTGTTGGG 7280  
 Q I I L Y V P C H L N S Q V V T L C Q F A C . I L L G  
 R L F Y M F R A I . T V K L . L C A S L H A R Y C W  
 T D Y F I C S V F S K O S S C D S V P V C M L D T V G

GAATGGTGTAGAAGACATCTGACCTCAGTGAAGTCTGACAGTGTAAATACACTATACGGGCATGCCTGCATGCAAGCCT 7360  
 N G V E D I . P Q . T A D S V N T L Y G H A C M Q A  
 G M V . K T S D L S E L L T V L I H Y T G M P A C K P  
 E W C R R H L T S V N C . Q C . Y T I R A C L H A S L

GTGTGTATGTGCATGCATATGCACACACATACATATGACCATATAGCAATCTTTTATCTCTCTTCTTAGCACAGAAGGT 7440  
 C V Y V H A Y A H T Y I . P Y S I L L S L F L A Q K G  
 V C M C M H M H T H T Y D H I A F F Y L S S . H R R V  
 C V C A C I C T H I H M T I . H S F I S L L S T E G

TCAGTCAGTCCCGGGGGGACGACCAGAGGCGCTAGGCTGCTGGTAGTGTCACTGATGGAGAGTCCCATGATGGAGAG 7520  
 S V S P G G D D Q R P L G C W . L S L H E S P M M E R  
 Q S V P R G G T T R G R . A A G S C H . W R V P .  
F S Q S R G G R P E A A R L L V V V T D G E S H D G E

GAACCTCCAGCAGCGCTAAAGGCCTGTGAGGCTGGCAGAGTGACAGCTTATGGGATTGCGGTGAGACTTGATCAAGTCCA 7600  
 N F Q Q R . R P V R L A E . H V M G L R . D L I K S  
 G T S S S A K G L . G W Q S D T L W D C G E T . S S P  
E L P A A L K A C E A G R V T R Y G I A V R L D Q V Q

GTGTTTTGTTTGTGTGTATCGTATGTGTGATAT 7680  
 S C F V L C C I V C V C V C V C V C V C V C V Y V . Y  
 V V L F C V V S C V C V C V C V C V C V C M C D M  
 L F C F V L Y R V C V C V C V C V C V C V C V I

GTGTGCATGCATCAGTGACATACCATAGTGTATATGCGGGTCCAGAGAACAACCTCAGATGTTGGTCTCACCTTCCA 7760  
 V C M H Q C T Y H S V Y M R V R E Q P Q M L V L T F H  
 C A C I S A H T I V C I C G S E N N L R C W S S P S  
 C V H A S V H I F . C V Y A G Q R T T S D V G P H L P

TCTGTTCCAAAGTGGATATCTGTTCACTTCGGCATAAATAAGCCAGATTAGCTGACCCACAAGTCTTGGGCAGGTCT 7840  
 L V P N W I S C S L R H T I S Q I S . P T S L G Q V  
 I L F Q T G Y L V H F G I Q . A R L A D P O V L G R S  
 S C S K L D I L F T S A Y N K P D . L T H K S W A G L

TCTGTCTCAGCCCTCTGCTCTTGGTTTGAGGCATTCTGGAATTTACAGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGG 7920  
 F C L S L L S L G L R H S G I Y R . A . Y R I P A A R  
 S V S A S L L V . G I L E F T D K L D I E F L Q P G  
 L S Q P P V S W F E A F W N L Q I S L I S N S C S P

GGGATCCACTAGTCTAGAGCGCCGCCCAAGGGAG 7958  
 G I H . F . S G R H Q G S  
 G S T S S R A A A T K G  
 G D P L V L E R P P P R E

FIGURA 15f

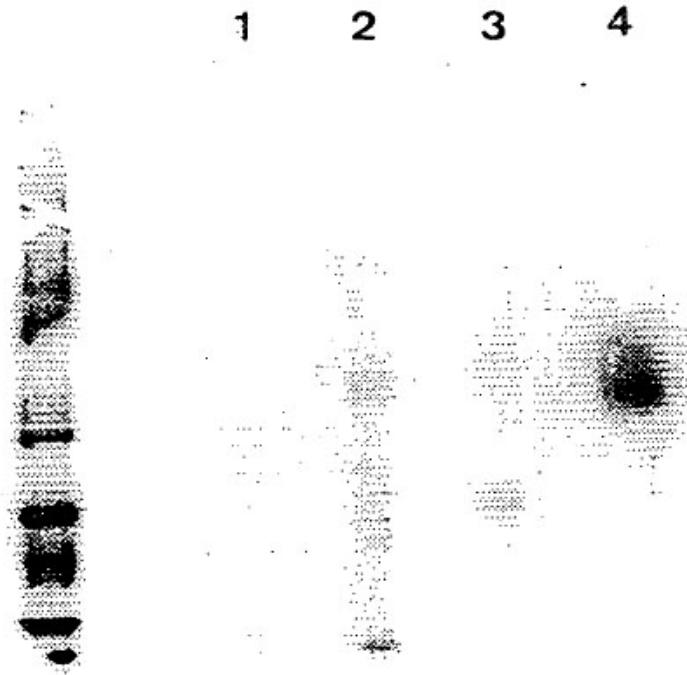


FIGURA 16



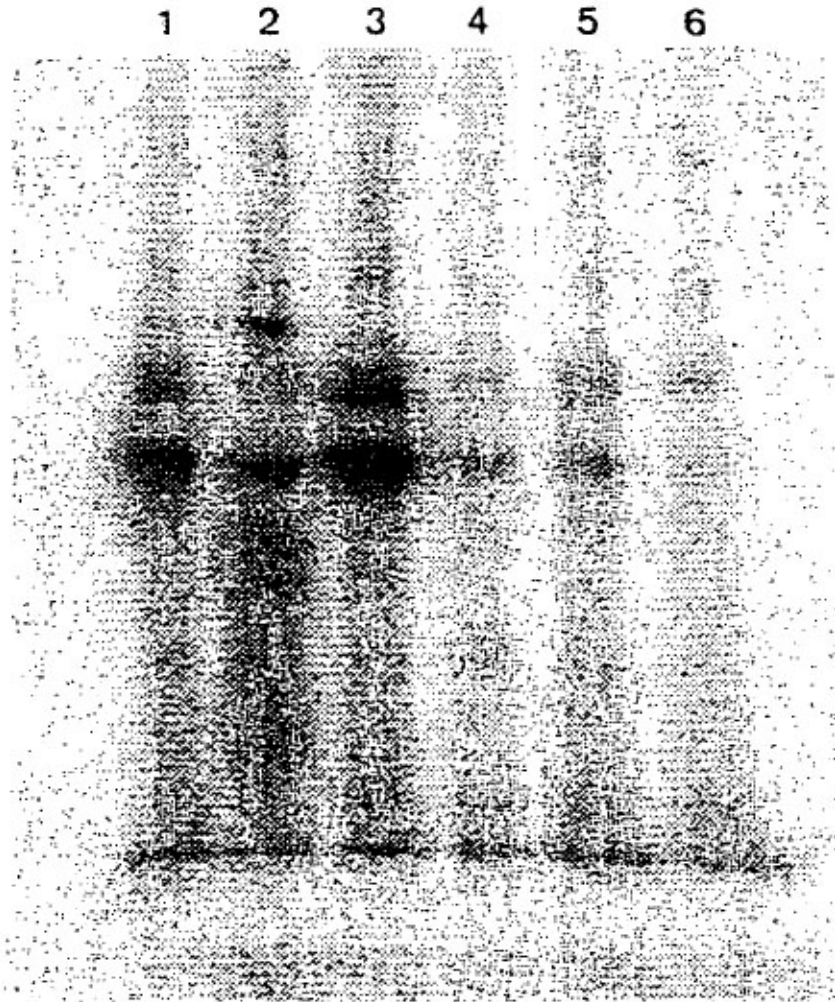


FIGURA 17